

Université de Montréal

**La provenance des boutures influence-t-elle le rendement et les taux de phytoextraction
des saules dans un sol contaminé?**

Par Sonia Beauchamp

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en sciences biologiques

mars, 2017

© Sonia Beauchamp, 2017

Résumé

La survie et la croissance des plantes sont essentielles afin d'assurer l'efficacité des protocoles de phytoremédiation et la décontamination des friches contaminées. La survie des saules et leur adaptation aux contaminants dépendent de la nature et de la concentration des contaminants. L'objectif de l'étude est d'identifier les cultivars ayant les meilleurs rendements, mais aussi de déterminer si la provenance des boutures (milieu contaminé ou milieu non contaminé) pourrait influencer la survie, la croissance et la phytoextraction (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) des saules. Nous avons comparé ces différents paramètres pour des boutures de dix cultivars de saules dans un milieu industriel fortement contaminé par les composés organiques et dans un milieu non-contaminé. Les variations dans la réponse des cultivars selon la provenance des boutures (milieu contaminé ou milieu non-contaminé) ont aussi été analysées dans chacun des sites d'étude. Selon nos résultats, le cultivar '5005' (*Salix alba*) est très productif en milieu extrêmement contaminé. Le cultivar 'S25' (*Salix eriocephala*) est aussi un choix très intéressant en phytoremédiation, puisqu'il produit près de deux fois plus de biomasse racinaire comparativement aux autres cultivars. La provenance des boutures n'a pas d'impact significatif sur la survie, la croissance et la phytoextraction pour la majorité des cultivars sauf pour le cultivar 'Millbrook', où les individus provenant du milieu contaminé ont produit significativement plus de biomasse aérienne lorsqu'ils poussaient en sol contaminé comparativement aux individus qui n'ont jamais été en contact avec les contaminants. Ces résultats pourraient aider à planifier des protocoles de phytoremédiation plus efficaces, en sélectionnant les cultivars de saule les plus adéquats et en élaborant l'échantillonnage des boutures utilisées dans les sites appropriés.

Mots-clés: phytoremédiation, phytoextraction, cultivars de saules, physiologie des saules, contamination, provenance des boutures, expérience de transplantation réciproque

Abstract

Plant survival and growth are essential parameters to monitor the effectiveness of phytoremediation protocols and the eventual decontamination of brownfields. The ability of different willow cultivars to survive and adapt to contaminants in polluted soils depends on the nature and concentration of the contaminants. The objective of the study was to identify the cultivars with the highest yields, but also to determine whether the origin of the cuttings (contaminated site or not) might influence survival, growth and phytoextraction of willow cultivars. We compared survival, growth and phytoextraction (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) of cuttings of ten willow cultivars in a highly organic-contaminated industrial environment and in an uncontaminated soil. Variations in the response of the cultivars according to the origin of the cuttings were also analyzed for each sites. According to our results, cultivar '5005' (*Salix alba*) was very productive in an extremely contaminated environment. Cultivar 'S25' (*Salix eriocephala*) was also a relevant choice, as it produced nearly twice more root biomass compare to other cultivars. The origin of the cuttings did not have significant influence on survival, growth and phytoextraction for almost all cultivar except the 'Millbrook' cultivar: individuals originating from the contaminated environment produced significantly more aboveground biomass when growing in the contaminated environment compared to individuals who had never been in contact with contaminants. These results could help build more effective phytoremediation protocols in highly contaminated environments by selecting adequate willow cultivars and sampling cuttings in an appropriate environment.

Keywords : phytoremediation, phytoextraction, willow cultivars, willow physiology, contamination, origin of cuttings, reciprocal transplant experiment.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures	v
Liste des sigles	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	viii
Introduction.....	1
Article	20
Discussion	47
Conclusion	52
Bibliographie.....	54

Liste des tableaux

Tableau I.	Caractéristiques des sols du site contaminé et du site non-contaminé.....	26
Tableau II.	Les cultivars de saules (<i>Salix spp.</i>) étudiés dans le projet.....	27

Liste des figures

Figure I.	Exemple d'un bloc du design expérimental.....	28
Figure II.	La survie des cultivars de saules.....	31
Figure III.	Biomasse aérienne des cultivars de saules dans les deux sites d'étude.....	32
Figure IV.	Biomasse racinaire.....	34
Figure V.	Capacité de concentration des éléments traces.....	35

Liste des sigles

HPs : Hydrocarbure pétrolier

HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

BPCs : Polychlorobiphényles

COV : Composés organiques volatils

TCE : Trichloroéthylène

MTBE : Méthyl tert-butyl éther

TNT : Trinitrotoluène

COD : Carbones organiques dissous

DCP : Dichlorophénol

Cd : Cadmium

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

Ni : Nickel

Pb : Plomb

Zn : Zinc

Liste des abréviations

Et al. : *et alii* (et les autres)

Etc. : Et cætera

Remerciements

Je voudrais remercier Michel Labrecque et Frédéric Pitre, pour leurs judicieux conseils, pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir cette recherche et de m'avoir accommodée pendant mon congé parental. Vous êtes des directeurs très sympathiques et je vous remercie pour votre temps. Je voudrais aussi exprimer toute ma reconnaissance à toute l'équipe du laboratoire Labrecque-Pitre, pour leur écoute, leur présence, leurs bons conseils, leur support moral et leur amitié. Un merci tout spécial à Stéphane Daigle pour ses conseils indispensables, à Cédric Frenette-Dussault pour son aide précieuse à la rédaction et pour son temps et sa patience, à Maxime Fortin-Faubert qui m'a si judicieusement conseillée, afin d'amener mon projet de recherche à un autre niveau, à Ahmed Jerbi et à Violette Barrière pour toutes les heures de travail manuel et l'énergie qu'ils ont dépensée sur mon terrain, de même que pour leurs sourires, leur présence et leur écoute. Bref, merci à tous les gens qui m'ont aidée de près ou de loin, j'ai rencontré des personnes en or durant mes deux années de maîtrise.

J'aimerais aussi souligner l'aide financière que j'ai reçue du FQRNT. Cette bourse m'a non seulement permis de me consacrer à 100% à mon projet, mais m'a aussi donné l'opportunité de profiter d'un congé parental, grâce à leur programme de soutien aux nouveaux parents.

Finalement, j'aimerais remercier tout mon entourage, ma famille et mes amis. En particulier, mon merveilleux conjoint, Steve Appleby, pour son support constant, son sens de l'humour, son dévouement, sa patience, son énergie et son amour. J'ai pu partager avec lui chacune des émotions vécues lors de ma maîtrise et son écoute m'a permis de traverser toutes les épreuves. Je n'aurais pas aussi bien réussi sans sa présence à mes côtés. Une partie de mon diplôme va aussi à mon père, grâce à l'éducation qu'il m'a inculquée et aux heures qu'il passe à mes côtés et à m'écouter. Finalement, un merci infini à mes deux enfants, Félix et Chloé Jeanne Appleby, d'être tout ce qu'ils sont et de remplir nos journées de sourires et d'énergie positive.

Introduction

Problème des sols contaminés

Plusieurs milliers de sites contaminés sont laissés à l'abandon sans se faire traiter dû au manque de ressources financières et de techniques efficaces. Ces sols pollués comportent généralement une soupe hétérogène de polluants. On y retrouve fréquemment plusieurs composés organiques complexes, comme des hydrocarbures pétroliers (HPs), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) des polychlorobiphényles (BPCs), des pesticides, de même que plusieurs composés organiques volatils (COV) (Edwards, 2003; Gerhardt et al. 2009). Ces molécules sont souvent persistantes dans l'environnement en ayant des demi-vies très longues dans les sols, les sédiments, l'air et dans les tissus biologiques où elles peuvent se bioaccumuler grâce à leur grande liposolubilité (Jones et de Voogt, 1999). Ces contaminants organiques peuvent avoir de graves conséquences sur la santé humaine, même à de faibles concentrations (Carpenter, 2006; Hites et al., 2006).

La contamination présente sur les sites contaminés peut aussi être de type inorganique. Certains éléments traces sont essentiels pour la croissance des plantes, mais deviennent toxiques lorsqu'ils sont présents à des concentrations anormalement élevées (FAO et ITPS, 2015). Malheureusement, plusieurs activités anthropiques, comme l'industrie minière, l'utilisation de moteurs à essence, la création de dépotoirs, l'utilisation de pesticides et d'engrais et l'émission de particules atmosphériques augmentent dangereusement la quantité d'éléments traces présents dans certains sols (Pierzynski, 2005). Les friches industrielles comportent souvent des concentrations assez élevées de contaminants inorganiques (Komives et Gullner, 2006). En Europe, les

éléments traces les plus répandus en milieux contaminés sont l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) (FAO et ITPS, 2015).

Le problème des sols contaminés prend de l'ampleur avec l'augmentation de la population mondiale. En 2017, ce problème ne se limite plus seulement aux sites miniers, mais s'étend sur la grandeur du territoire en milieux urbains, industriels et agricoles (Greger et Landberg, 1999). Le traitement de ces sols consiste généralement à l'excavation, l'entreposage et, dans quelque cas, à la décontamination par différents moyens, selon la nature des contaminants présents (Cunningham et al., 1995). Les méthodes de décontamination utilisées peuvent être des rinçages, des lavages ou même l'incinération (Ali et al., 2013). Ces techniques de décontamination coûtent très cher (Cunningham et Ow, 1996) et leur emploi n'est pas toujours possible sur de grandes surfaces. C'est sans doute ce qui explique que plusieurs terrains contaminés sont abandonnés sans être traités (Peuke et Rennenberg, 2005).

Qu'est-ce que la phytoremédiation?

La phytoremédiation est une méthode de décontamination des sols innovatrice et efficace. Il s'agit d'une approche différente, permettant de décontaminer les sols de façon écologique (Romantschuk et al., 2000), en utilisant les plantes et les microorganismes qui leur sont associés, afin d'éliminer, de stabiliser ou de dénaturer les contaminants (Ali et al., 2013). Il s'agit d'une technique proposée par Chaney en 1983 (Chaney, 1983) qui met en œuvre plusieurs mécanismes différents. La phytoextraction est l'accumulation des polluants (habituellement des éléments traces) dans la biomasse de la plante. La

phytodégradation est la dégradation des contaminants par diverses activités enzymatiques dans la plante ou dans la rhizosphère (Pilon-Smith, 2005). La rhizofiltration implique la diminution partielle ou totale des contaminants présents dans les eaux souterraines par l'action des racines des végétaux. La phytostabilisation entraîne la diminution de la biodisponibilité des polluants (Peuke et Rennenberg, 2005). Finalement, la phytovolatilisation utilise les plantes pour absorber, transformer et relâcher les contaminants dans l'atmosphère (Pilon-Smith, 2005).

En plus d'être une méthode de décontamination écologique, la phytoremédiation est aussi intéressante d'un point de vue économique, puisque son utilisation coûte moins cher que les techniques actuelles (Romantschuk et al., 2000). Sans compter qu'elle amène plusieurs autres avantages, comme le fait que son utilisation est possible sur de grandes surfaces et qu'elle implique peu d'installations et d'équipements. La décontamination des sols se fait in situ : le problème n'est donc pas déplacé ailleurs. De plus, elle permet de revégétaliser les sites pollués en redonnant un caractère esthétique au terrain tout en empêchant l'érosion du sol. Son utilisation a aussi une grande acceptabilité sociale. Malgré le fait que cette technique agisse de façon relativement lente, les sols pollués traités par phytoremédiation retrouvent éventuellement leur caractère naturel et peuvent être utilisés à d'autres fins (Ali et al., 2013).

L'efficacité de la phytoremédiation

Le succès de la phytoremédiation a été montré à plusieurs reprises depuis un peu plus de deux décennies, autant pour la décontamination d'éléments inorganiques que pour les polluants organiques. Les plantes sont capables de nettoyer un milieu contenant des

éléments traces par phytoextraction, phytostabilisation et/ou rhizofiltration (Salt et al., 1995; Landberg et Greger, 1996; Guidi et al., 2011). Par exemple, en un an, une culture de saule aurait le potentiel de purifier des terres agricoles fertilisées pendant 100 ans par des engrais riches en Cd (Robinson et al., 2000). De plus, dans un sol ayant de 6 à 100 fois plus de Zn que le seuil «non-contaminé» (MDDELCC), des concentrations de 7500 ppm de Zn ont été quantifiées dans les parties aériennes de saules (*Salix viminalis*) et des taux de phytoextraction de 1.7 kg/ha ont été enregistrés (Roy et al. 2005). Puis, bien que le cuivre et le plomb soient des métaux habituellement moins biodisponibles pour les plantes (Pulford et Watson, 2003), certaines espèces réussissent tout de même à en accumuler dans leurs biomasses, permettant une phytoextraction à long terme (Landberg et Greger, 1996; Rosselli et al., 2003; Bissonnette et al., 2010). L'ajout d'agents chélateurs peut aussi augmenter la biodisponibilité des métaux dans le sol et faciliter leur extraction par les plantes (Komives et Gullner, 2006).

Utiliser la phytoremédiation pour décontaminer les sols pollués par des contaminants organiques peut aussi s'avérer très efficace (Cunningham et al., 1995; Yan-zheng et Li-zhong, 2003; O'Niell et Nzungu, 2004, Peuke et Rennenberg, 2005). En effet, certaines plantes peuvent biodégrader, séquestrer et/ou volatiliser plusieurs composés organiques, comme le trichloroéthylène (TCE), le méthyl tert-butyl éther (MTBE), les BPCs, certains herbicides comme l'atrazine, (Pilon-Smith, 2005), des explosifs comme le trinitrotoluène (TNT) (Thompson et al. 1998a; Susarla et al. 1999) et des hydrocarbures pétroliers comme l'huile, le gaz et le toluène (Olson et al., 2003). De plus, en milieu hydroponique, des saules (*Salix babylonica*) peuvent réussir à diminuer la concentration d'éthanol dans l'eau de 99%, en une semaine (Corseuil et Moreno, 2001).

Sur un terrain contaminé, la concentration de benzène peut diminuer de 50% et de 99, 96 et 100% pour le chlorure de vinyle, le 1,1-dichloroéthane et le 1,2-dichloroéthane respectivement, en seulement une saison de croissance suite à la plantation de saules. Par ailleurs, les HAP peuvent être efficacement éliminés du sol par les saules: des chercheurs ont noté une diminution de 97 % de leur concentration en une seule saison de croissance (Guidi et al. 2011). De plus, d'autres composés organiques comme le 1,4-Dioxane (Aitchison et al. 2000) et le TCE (Gordon et al., 1998) présents dans des sols contaminés ont aussi vu leur concentration diminuer suite à la mise en place de plantations de peuplier à des fins de phytoremédiation. Bref, dans la littérature scientifique, plusieurs chercheurs ont publié des résultats encourageants, valorisant la phytoremédiation comme solution au problème mondial des sols contaminés. Plusieurs études sont présentement en cours, mais tout semble indiquer que la phytoremédiation est une technique efficace de décontamination des sols et que son utilisation en milieu urbain serait un réel avantage.

Les espèces utilisées en phytoremédiation

Plusieurs espèces végétales sont de bonnes candidates dans les protocoles de phytoremédiation. Le tournesol, la moutarde, la luzerne et le ricin ont prouvé leur efficacité dans des protocoles de phytoextraction du cadmium et du plomb (Niu et al. 2007). La moutarde brune (*Brassica juncea*) a des capacités de phytoextraction de cadmium (Salt et al., 1995b), du zinc, du plomb et du cuivre efficaces (Roy et al., 2005). Les facteurs de bioconcentration du cadmium chez cette plante sont de plus de 1100 dans les tiges et 6700 dans les racines (Salt et al., 1995b; Su et al., 2004). En plus de son efficacité à accumuler les métaux, elle est aussi très tolérante aux contaminants et elle

produit des quantités appréciables de biomasse (Pitre et al., 2010). *Brassica juncea* est donc grandement utilisée dans les protocoles de phytoremédiation, au Canada. De plus, des plantes hyperaccumulatrices, comme l'arabette de Haller (*Arabidopsis halleri*) et le tabouret bleu (*Thlaspi caerulescens*) peuvent extraire de grandes quantités de métaux (Fischerova et al., 2006). Les plantes hyperaccumulatrices ont le potentiel d'accumuler les éléments inorganiques à des taux jusqu'à 100 fois plus grands que les autres espèces (Mengoni et al., 2010). La fétuque faux roseau (*Festuca arundinacea*) a aussi fait ses preuves dans un protocole de phytoextraction d'éléments traces (Zn, Pb et Cu) (Roy et al., 2005) et de phytoremédiation des BPC (Zeeb et al., 2006) et du TNT (Khrishnan et al., 2000). Ce polluant peut aussi être phytoremédié par le brome inerme (*Bromus inermis*), une espèce de la famille des *Poaceae*. L'agropyre élevé (*Thinopyrum ponticum* ou tall wheat grass), l'élyme de l'Altaï (*Elymus angustus*) et la luzerne (*Medicago sativa*) ont montré leur capacité à phytoremédier des hydrocarbures pétroliers (Phillips et al., 2009). De plus, le taro (*Colocasia esculenta*), la canne flèche (*Gynerium sagittatum*) et le balisier bec de perroquet (*Heliconia psittacorum*) sont efficaces pour phytoextraire plus de 90% du Cd, du Hg, du Cr et du Pb d'une eau contaminée, en plus d'être capables de la purifier de 66% des carbones organiques dissous (COD), 67% du TKN et 72% du NH₄ présents au départ (Medera-parra et al., 2015). Finalement, d'autres herbacées comme *Glycine max*, *Phalaris arundinacea*, *Lolium multiflorum*, *Carex normalis* et trois variétés de *Cucurbita pepo ssp.* ont aussi été utilisées dans des protocoles de phytoremédiation des BPC (Zeeb et al., 2006).

Toutes les espèces mentionnées ci-dessus sont des plantes herbacées. Pour la plupart, elles accumulent beaucoup d'éléments traces et elles sont relativement

productives en phytoremédiation (Roy et al., 2005). Habituellement, ces végétaux ont aussi une bonne capacité à s'établir dans des sols pollués et sont tolérants à la présence de contaminants. Par contre, elles demandent beaucoup plus d'entretien et de manipulations dans un protocole de phytoremédiation (Pitre et al., 2010). C'est pourquoi, en phytoremédiation, des plantes vivaces et lignifiées sont souvent privilégiées et grandement utilisées.

En phytoremédiation, les auteurs s'entendent pour proposer deux stratégies différentes: utiliser des plantes hyperaccumulatrices, ou encore, choisir des végétaux qui ont une grande production de biomasse, mais qui ont un taux d'accumulation plus faible que les hyperaccumulatrices (Guidi et al., 2011). Il est vrai qu'en général les plantes hyperaccumulatrices ont des croissances très lentes et produisent peu de biomasse, ce qui n'avantage pas la décontamination du sol (Greger et Landberg, 1999; Pilon-Smith, 2005). Il est donc important de considérer l'indice de remédiation (*remediation factor (Rf)*), afin de choisir l'espèce végétale la plus appropriée lors de l'établissement de protocoles de phytoremédiation. Ce facteur indique la capacité d'une plante à enlever les contaminants d'un volume de terre, en respectant l'accumulation de l'élément dans la plante, mais aussi le rendement et la croissance de la plante ($Rf = ((\text{facteur de bioconcentration} \times \text{biomasse}) / \text{concentration dans le sol}) \times 100$) (Zhao et al., 2003; Fischerova et al., 2006). Lors de ces calculs, les plantes avec des taux d'accumulation plus faibles peuvent compenser par une grande production de biomasse. En effet, plus la plante produit de biomasse, plus les taux de contaminant extrait du sol sont grands. Par exemple, certaines espèces de saule peuvent avoir une efficacité de phytoremédiation jusqu'à cinq fois plus grande que les plantes hyperaccumulatrices, grâce à leur forte production de biomasse et

leur transport plus efficace du Cd et du Zn des racines jusqu'à la biomasse aérienne (Greger et Landberg, 1999).

Donc, en phytoremédiation, on valorise généralement des espèces ayant une bonne production de biomasse leur permettant de retirer une plus grande quantité de polluants du sol (Guidi et al., 2011). Il est aussi avantageux que les plantes choisies soient compétitives, robustes et qu'elles puissent résister aux contaminants dans le sol (Pilon-Smith, 2005). De plus, comme la contamination se situe au niveau de la rhizosphère, il est primordial de valoriser des plantes ayant de bonnes capacités de croissance racinaires en milieux contaminés pour favoriser la décontamination. Une plante qui aura un système racinaire plus étendu et plus en profondeur améliorera l'efficacité de la décontamination. En effet, non seulement elle aura un taux de décontamination plus élevé, mais elle pourra aussi favoriser la présence d'un plus grand nombre de microorganismes (Susurla et al., 2002).

En considérant toutes ces caractéristiques, les saules, des plantes ligneuses de début de succession, ont souvent été choisis pour la décontamination des sols. Ces végétaux sont d'ailleurs reconnus pour leur capacité à s'établir dans presque tous les types de milieux. En effet, les saules peuvent même s'établir en milieu anoxique où ils peuvent non seulement pousser (Guidi et al., 2011), mais aussi entreprendre la décontamination des éléments organiques (Corseuil et Moreno, 2001) et inorganiques (Greger et Landberg, 1999) du sol. Ils ont aussi une forte tolérance aux contaminants (Newman and Reynolds, 2005; Yu et al., 2005), une croissance rapide (Greger and Landberg, 1999), un taux de transpiration élevé (Trapp and Karlson, 2001) et des taux de phytoextraction très efficaces (Pitre et al., 2010). Leur capacité à rejeter après le recepage

(c'est-à-dire des coupes cycliques de la biomasse aérienne) sans influencer négativement la survie de la plante (Labrecque and Teodorescu, 2003; Labrecque et Teodorescu, 2005) constitue un autre avantage important. De plus, ces arbustes sont aussi avantageux, puisqu'ils sont vivaces et qu'ils atteignent une production de biomasse optimale après quelques saisons de croissance (Roy et al., 2005; Pitre et al., 2010).

Les différents géotypes de saule

Plusieurs cultivars (*cultivated variety*) de saules ont été créés afin d'obtenir des individus présentant de meilleurs rendements, ou une meilleure résistance aux maladies ou ravageurs. À ce jour, il existe des centaines de cultivars différents provenant de dizaines d'espèces de saules issus du Canada, des États-Unis, d'Europe et du Japon (Tharakan et al., 2005). Plusieurs études ont comparé les performances de certains cultivars de saules. En milieu non-contaminé, pendant la première année de croissance des boutures, Labrecque et Teodorescu (2005) obtiennent les meilleurs résultats de production de biomasse chez le cultivar 'S25' (*Salix eriocephala*), alors que Grenier et al. (2015), chez le cultivar 'SV1'. Pourtant, après 4 ans, il s'agirait plutôt des cultivars cultivés à partir de *Salix miyabeana* ('SX61', 'SX64' et 'SX67') qui produiraient le plus de biomasse, (Labrecque and Teodorescu 2005; Tharakan et al., 2005). Puis, dans un milieu moyennement contaminé, contenant entre autres 0.5 mg/kg de BPC, 957 mg/kg de C10-C50 et quelque HAP, le cultivar 'SX61' maintient sa grande production de biomasse, mais le cultivar 'SX67' semble être plus affecté par la contamination (Grenier et al., 2015). De plus, le cultivar '5005' (*Salix nigra*) n'est pas aussi productif en termes de biomasse que les cultivars mentionnés ci-dessus en milieu non-contaminé, mais il

semble être un très bon candidat pour les protocoles de phytoremédiation puisqu'il produit autant de biomasse en milieu sain qu'en milieu moyennement contaminé, contrairement à 'SV1' (un hybride de *Salix dasyclados*) et 'Fish Creek' (*Salix purpurea*) qui s'adaptent plus difficilement aux contaminants. Ces deux derniers peuvent perdre environ 70 % de leur biomasse en présence de contaminants organiques (Grenier et al., 2015).

Les cultivars de saule peuvent se diviser en deux groupes selon leur différente stratégie de croissance (Tharakan et al., 2005). Le premier groupe rassemble les cultivars produisant beaucoup de tiges à faible diamètre. Ils ont une surface foliaire faible, mais un contenu en azote élevé. Dans ce groupe, on retrouve, entre autres le cultivar 'Fish Creek' (Grenier et al., 2015) et le cultivar '5027' (*Salix viminalis*) (Tharakan et al., 2005). Le second groupe comporte des cultivars qui produisent peu de tiges, mais dont le diamètre est plus gros. Ils ont une grande surface foliaire, mais un contenu en azote plus faible. Dans ce groupe, on retrouve, entre autres, les cultivars 'SX61', 'SX64' et 'SX67' qui ont aussi les tiges les plus hautes (Tharakan et al., 2005). La stratégie de croissance de ce dernier groupe semble avantager une production de biomasse légèrement supérieure et les individus présents dans ce groupe sembleraient être plus efficaces dans les protocoles de phytoremédiation.

L'effet des contaminants sur la physiologie des saules

Malgré tous les avantages des saules en phytoremédiation, ceux-ci ont tout de même des limites de tolérance face aux contaminants. Les milieux contaminés sont des environnements stressants où les conditions ne sont pas optimales et où l'équilibre de la

plante peut être déstabilisé en entraînant des effets toxiques (Gaspar et al., 2002). La présence de certains hydrocarbures, comme l'essence et le diesel, peut avoir des conséquences sur la physiologie des saules. Par exemple, en milieu hydroponique, une diminution de 50% de la transpiration de *Salix alba* peut être observée lorsque la concentration dans l'eau atteint 4000 mg/kg, ce qui indique que la plante subit un stress et que son métabolisme est affecté (Trapp et al., 2001). Par contre, c'est tout de même seulement à 10 000 mg/kg que certains effets toxiques (chlorose et nécrose) sont observés (Trapp et al., 2001). De plus, il a été démontré que des concentrations élevées en composés organiques volatils (COV), parmi lesquels on retrouve les composés aliphatiques chlorés, peuvent affecter le développement des plantes, comme la biomasse, la transpiration, la croissance, la couleur des racines, la conductance stomatique, la longueur des tiges et la surface foliaire (Ferro et al., 1999; Dietz et Schnoor, 2001). Les composés phénoliques sont des molécules aromatiques portant au moins un groupement hydroxyle (-OH). Les saules sont très tolérants à ces contaminants, mais lorsqu'ils sont en contact avec plus de 100 mg/L en milieu hydroponique, la transpiration diminue environ de 30%. À 500 mg/L, elle diminue de 70% et les arbres montrent des effets toxiques, comme le flétrissement des feuilles et une chlorose (Ucisik et Trapp, 2006). La présence du 3,5-Dichlorophénol (DCP) et du 2,4-DPC entraîne également des effets visibles notamment le jaunissement et le dessèchement des feuilles (Trapp et al., 2000; Usicik et al., 2007). Une augmentation de la concentration de DCP fait diminuer graduellement la croissance et la biomasse des saules. En effet, à 100 mg de 3,5-DCP/L, la croissance des plantes est faible et la production de biomasse diminue (Trapp et al., 2000). D'un autre côté, bien que les saules puissent tolérer la présence de grandes

quantités d'éléments traces dans le milieu, ils ont quand même des limites de tolérance. L'effet le plus marquant de la toxicité d'une grande concentration de Cd chez les saules est la réduction de la croissance (Cosio et al., 2006). D'autres signes toxiques visibles peuvent aussi apparaître, comme une chlorose des feuilles, le roulement des bords des feuilles et des changements dans les allocations de biomasse, dans la longueur et la couleur des racines. Ces effets toxiques augmentent en relation proportionnelle avec la concentration de Cd, sauf au-delà d'un seuil, à de grandes concentrations, où les effets diminuent radicalement et sont beaucoup moins importants, probablement dû à un mécanisme de défense activé par la plante (Cosio et al., 2006). Une forte concentration de chrome (III) peut aussi influencer la transpiration, la quantité de protéines solubles dans les feuilles, le niveau de chlorophylle et l'activité enzymatique des saules (Yu et Gu, 2007). Finalement des effets toxiques peuvent être visibles chez les plantes lorsque les concentrations sont relativement élevées. Malgré tout, les plantes ont développé certains mécanismes leur permettant de mieux tolérer un milieu stressant.

Les mécanismes d'acclimatation des plantes : la plasticité phénotypique

Les plantes n'étant pas mobiles, elles font constamment face aux variations environnementales de leur milieu. Afin d'assurer leur croissance et la survie de leur descendance, les populations végétales doivent développer des mécanismes leur permettant d'améliorer leur tolérance à diverses situations stressantes, comme le manque d'eau, les grands écarts de température, la présence de pathogènes, la salinité, la contamination du milieu, etc. En condition de stress, le métabolisme des plantes peut être influencé par plusieurs facteurs (Filippou et al., 2013). Les plantes ont développé des

mécanismes moléculaires de défense contre les stress biotiques et abiotiques, qui sont souvent reliés à des modifications physiologiques comme une altération de la croissance et du patron de développement (Gaspar et al., 2002).

Les variations phénotypiques entre les individus peuvent être causées par des différences génétiques ou par des différences dans les réserves en nutriments, en hormones ou en toxines (Boyko et al., 2010). Ces variations peuvent également être le résultat de la plasticité phénotypique intrinsèque aux espèces végétales considérées (Bossdorf et al., 2008). Dans ce dernier cas, les plantes ajustent leur phénotype en fonction des conditions environnementales (Mousseau et al., 2009). Par exemple, certaines variations environnementales, comme la quantité de précipitations annuelles, peuvent influencer la grosseur des feuilles, le nombre de stomates et leur répartition chez un saule (*Salix miyabeana*, cultivar ‘SX67’) (Fontana et al., 2017). Ce genre de résultats a aussi été observé pour 29 autres espèces de saules : l’humidité du sol influence la densité des stomates sur les faces abaxiales des feuilles (Chen et al., 2008). La température peut aussi occasionner des variations phénotypiques au sein d’une espèce, en modulant le nombre de stomates sur les feuilles des individus (Woodward, 1986).

Certains chercheurs ont suggéré que les plantes pourraient même s’acclimater (ou se conditionner) à une induction plus rapide de leurs mécanismes de défense contre les stress environnementaux auxquels elles sont soumises (Beckers et Conrath, 2007). Par exemple, la contamination pourrait amener des végétaux dans un «priming state», où leurs capacités à activer leurs mécanismes de défense sont améliorées (Beckers et Conrath, 2007; Pozo et al., 2009). Le *priming state* peut induire plusieurs types de défenses différentes et être activé très tôt lorsque le stress est perçu, comparativement à

des mécanismes de défense «normaux» qui sont activés plus tardivement dans le temps. Ce mécanisme est avantageux puisqu'il est plus rapide, plus fort et plus soutenu qu'un mécanisme normal (Martinez-Medina et al., 2016).

Un des processus expliquant la plasticité phénotypique est l'épigénétique (Rival et al., 2010). L'environnement de l'individu peut entraîner des variations dans l'expression et la fonction des gènes, sans modifier la séquence d'ADN (Bossdorf et al., 2008). Ces variations peuvent être causées par la méthylation des cytosines ou par des modifications dans la structure de chromatine, suite à l'acétylation ou la méthylation des histones (Bird, 2002). S'en suit une activation ou une inhibition de l'activité des gènes ciblés, modulant ainsi l'expression protéique (Bossdorf et al., 2008). Ce processus permet à la plante de mieux tolérer les conditions environnementales auxquelles elle fait face (Holliday, 2006; Rival et al., 2010).

Ces modifications sont d'autant plus intéressantes du fait qu'elles sont réversibles (Boyko et Kovalchuk, 2011) et cette plasticité phénotypique peut même se transmettre d'une génération à l'autre. Ce processus de transfert a été nommé plasticité transgénérationnelle (aussi appelé effet maternel ou effet parental) (Fieldes et Amyot, 1999; Latzel et al., 2014; Mousseau et al., 2009) et a grandement été étudié dans la dernière décennie. Ce mécanisme implique une variation dans le phénotype des plantes, selon les conditions environnementales expérimentées par leurs plantes mères (Galloway et Etterson, 2007). La plante mère transmet à ses descendants les modifications phénotypiques qu'elle a subies suite à l'exposition à certaines variations environnementales. Ce transfert «d'informations» est une étape importante dans le cycle

de vie des plantes (Donohue, 2009), leur permettant de mieux tolérer les stress environnementaux (Galloway et Etterson, 2007).

La littérature scientifique comprend plusieurs exemples de plasticité transgénérationnelle. Par exemple, l'environnement lumineux d'une plante (*Campanulastrum americanum*) peut influencer significativement le cycle de vie (annuel vs. biennuel) et la croissance de sa progéniture. Les jeunes plantes poussant dans le même environnement lumineux que leur mère (comme c'est souvent le cas chez les plantes) sont alors avantagées (Galloway et Etterson, 2007). De plus, la présence ou non de nutriment dans le milieu peut aussi moduler l'épigénome d'une plante. Cette information peut ensuite être transmise à ses descendants, afin de favoriser leur productivité dans un tel milieu (Latzel et al., 2014). Dans un sol limitant en nutriment, les jeunes plantes (*Plantago lanceolata*), issues de mères ayant expérimenté ce stress, fleurissent cinq jours plus tard que ceux provenant d'une mère n'ayant aucune expérience d'un milieu limitant en nutriment. De plus, la progéniture de la mère ayant connu un environnement limitant produit plus de biomasse dans ce milieu et y concentre plus de carbone dans ses racines, que les jeunes plantes provenant d'une mère n'ayant pas cette expérience (Latzel et al., 2014). L'expérience d'une plante (*Arabidopsis thaliana*) au froid peut aussi améliorer le rendement photosynthétique des générations suivantes exposées aux mêmes conditions, grâce à la régulation des gènes chez la mère, ensuite transmise à sa descendance (Blödner et al., 2007). De plus, Molinier et al. (2006) ont montré que les répercussions de l'exposition d'une plante mère (*Arabidopsis thaliana*) à un rayonnement de courte longueur d'onde (ultraviolet-C) peuvent être observées dans l'épigénome de sa descendance pendant plusieurs générations, même en l'absence du stimulus. Ces

modifications peuvent éventuellement favoriser une adaptation (Molinier et al., 2006). Par la plasticité trans générationnelle, la plante mère peut aussi influencer la force et le mode de la sélection naturelle sur la germination, en plus de réguler les gènes qui s'exprimeront lors de la germination (Donohue, 2009). Tous ces résultats suggèrent que la mère peut transmettre à ses descendants, via la plasticité transgénérationnelle, certains avantages pour pouvoir mieux faire face aux conditions environnementales locales. (Galloway et Etterson, 2007). Les processus responsables de la plasticité phénotypique (par exemple l'épigénétique), et de sa transmission d'une génération à l'autre, jouent un rôle important dans les variations naturelles et dans la démographie des populations végétales; ils sont une composante fondamentale du cycle de vie des plantes et de leur microévolution (Bossdorf et al., 2008).

Les mécanismes d'acclimatation des plantes : l'adaptation

D'autres chercheurs ont aussi analysé la tolérance des plantes aux stress environnementaux, mais sous l'angle d'une évolution typique : c'est-à-dire où des changements dans les fréquences alléliques surviennent chez les individus dans les populations au fil du temps. Après plusieurs générations, ces changements permettent aux individus de s'adapter aux conditions auxquelles ils font face. Cette adaptation diffère du concept de plasticité transgénérationnelle, où aucunes modifications à la séquence d'ADN ne sont impliquées.

Par exemple, des recherches sur des sites miniers, où les sols sont fortement contaminé par les éléments traces, ont montré que certaines plantes herbacées (*Agrostis tenuis*, *Anthoxanthum odoratum* et l'hybride *Agrostis tenuis x stolonifera*) peuvent

s'adapter à la présence élevée de contaminants inorganiques (Jowett, 1964; Gregory, 1965; Antonovics et al., 1971; Wiltshire, 1974). En effet, en sol contaminé, lorsque les chercheurs ont comparé des plantes s'étant développés en présence de contaminants depuis plusieurs générations à des individus «normaux» (n'ayant jamais été en contact avec des contaminants), ils ont observé plusieurs différences significatives entre les deux groupes d'individus. En milieu minier, les plantes qui se sont établies sur ce sol depuis plusieurs générations sont plus tolérantes et productives que des individus de la même espèce prélevés en milieu non-contaminé et n'ayant jamais été en contact avec ces contaminants (Jowett, 1964; Gregory 1965; Antonovics et al., 1971; Wiltshire, 1974). Des individus poussant dans un milieu minier contaminé s'adaptent aux contaminants et présentent moins de signes de toxicité (Gregory 1965). Ce concept et ce type de dispositif, où l'on compare, en milieu contaminé, la productivité des individus «normaux» à celle des individus ayant poussé en présence de contaminants pourraient être intéressants à analyser sous l'angle de la phytoremédiation, impliquant la plasticité phénotypique plutôt qu'une adaptation typique.

Plasticité phénotypique en phytoremédiation

Habituellement, dans un contexte de phytoremédiation, les plantations sont mises en place en prélevant des boutures sur des plantes mères au printemps. Ces boutures sont ensuite plantées dans le sol contaminé à traiter. Selon les résultats des recherches portant sur la plasticité phénotypique et sur l'adaptation, on sait maintenant que l'environnement, d'où les boutures sont récoltées, pourrait avoir une influence sur leur productivité. Dans un cadre de phytoremédiation, serait-il avantageux d'utiliser des boutures prélevées sur

des plantes s'étant développées sur des milieux contaminés pour établir les plantations? Dans ce cas, il est important de noter que le mécanisme qui régirait les changements potentiellement perçus serait la plasticité phénotypique. En effet, les boutures étant des clones, une seule génération est en jeu, rendant impossible l'observation d'une adaptation typique ou d'une évolution classique. Si des différences étaient perçues, il s'agirait plutôt d'une acclimatation, faisant intervenir des modifications sur l'épigénome (Bird, 2002; Bossdorf et al., 2008; Rival et al., 2010) ou alors elles seraient dues à des réserves en nutriments, en hormones ou en toxines différentes chez les deux types de boutures (Boyko et al., 2010).

Un projet de phytoremédiation en friche industrielle

Les friches industrielles comportent souvent des sols très contaminés par les déchets et les rejets industriels générés durant les activités. Ces friches sont fréquentes en milieu urbain et la phytoremédiation pourrait être une méthode avantageuse pour réhabiliter ces sites. La réponse des saules en milieu contaminé a souvent été étudiée (Vyslouzilova et al., 2003, Guidi Nissim et al., 2014, Grenier et al., 2015), mais, selon nos connaissances, la physiologie des saules poussant dans les friches industrielles fortement contaminées, par exemple où des milliers de mg/kg d'hydrocarbures pétroliers sont présents, est mal documentée. Des informations cruciales manquent encore pour avoir une meilleure compréhension des répercussions d'une contamination extrême sur les saules.

Premièrement, nous ne savons pas quels cultivars de saule ont les meilleurs taux de survie, de croissance et d'efficacité phytoremédiatrice dans les friches fortement contaminées. De plus, nous ne savons pas si la plasticité phénotypique peut influencer

l'efficacité de phytoremédiation chez les différents cultivars de saules. En effet, Jowett (1964), Gregory (1965), Antonovics et al. (1971) et Wiltshire (1974) ont avancé que, grâce à une évolution typique sur plusieurs générations en milieu minier, les individus habitués aux contaminants s'y adaptent et sont plus efficaces dans ce type de milieu comparativement à des individus n'ayant jamais été en contact avec les contaminants. Il est donc intéressant de tester cette hypothèse dans un contexte de phytoremédiation, où c'est plutôt la plasticité phénotypique qui pourrait influencer les individus, afin de voir si les saules qui poussent en milieu contaminé peuvent s'acclimater à ce genre de milieu. Dans ce cas, il serait alors avantageux de prélever les boutures utilisées dans les dispositifs de phytoremédiation sur des plantes mères dans un milieu contaminé semblable à celui à décontaminer.

GénoRem

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai joint le groupe GénoRem créé en 2011 suite à un financement de Génome Canada et Génome Québec. Ce groupe de recherche était composé de plus de 30 chercheurs de différents domaines à l'Université de Montréal et à l'Université McGill. Le groupe s'intéressait aux techniques de décontamination de sols pollués afin d'améliorer leur utilisation. Grâce à l'ensemble des projets de recherches qui ont été conduits, GénoRem souhaitait proposer aux instances gouvernementales et aux entreprises concernées des protocoles de gestion des sols contaminés efficaces et respectueux de l'environnement. Mon projet s'intègre donc à cette démarche générale du groupe GénoRem.

Objectifs

Dans la présente étude, nous avons évalué la production de biomasse, les taux de survie et les capacités de phytoextraction (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) pour dix cultivars de saule provenant d'un site fortement contaminé par des déchets industriels et nous les avons comparés aux mêmes cultivars provenant d'un environnement non contaminé. L'objectif principal de l'étude est d'identifier le ou les cultivars ayant les meilleurs rendements de survie, de croissance et de phytoextraction en milieu fortement contaminé, mais aussi de déterminer si la provenance des boutures (milieu contaminé ou milieu non-contaminé) peut avoir une influence sur la productivité des saules.

Parmi les cultivars sélectionnés, nous prévoyons que le cultivar 'SX61' affiche les taux de survie et de production de biomasse les plus élevés en milieu contaminé, correspondant à ce qui a été observé dans un milieu légèrement contaminé (Tharakan et al., 2005; Grenier et al. 2015). Ce cultivar devrait aussi avoir un meilleur taux de phytoextraction (Pullford et Watson, 2003; Greger and Landberg, 1999). Nous avons également émis l'hypothèse que le cultivar '5005' aurait de bons taux de survie et de production de biomasse en milieu fortement contaminé, puisqu'il semble présenter des rendements similaires dans un environnement non contaminé et dans un environnement moyennement pollué (Grenier et al., 2015). D'un autre côté, nous nous attendions à ce que les boutures ayant été prélevées chez des saules en milieu contaminé aient des taux de survie, une production de biomasse et des capacités de phytoextraction plus élevés dans le milieu contaminé. Les individus provenant du milieu contaminé seront plus productifs en milieu contaminé comparativement aux individus provenant du milieu non-contaminé.

**Does the origin of cuttings influence yield and phytoextraction potential of
willow in contaminated soil?**

Sonia Beauchamp¹; Cédric Frenette Dussault¹; Frédéric E. Pitre ^{1*}; Michel Labrecque ¹

¹ Institut de recherche en biologie végétale, 4101 Sherbrooke East, Montreal, Québec,
Canada, H1X 2B2

* Corresponding author

E-mail address: frederic.pitre@umontreal.ca

Article scientifique

Soumis à la revue Ecological Engineering, le 31 mars 2017.

Authors' contribution statement: M. Labrecque and F. Pitre conceived the project and set up design. S. Beauchamp was responsible for data collection, statistical analysis and interpretation of data. S. Beauchamp and C. Frenette Dussault authored the initial draft of the manuscript. M. Labrecque and F. Pitre provided a critical review and also approved the final version.

Key words:

Phytoremediation, phytoextraction, willow cultivar, biomass, inorganic and organic pollutants, origin of cuttings, reciprocal transplant experiment

Abstract

The ability of different willow cultivars to survive and adapt to contamination in polluted soils can vary according to the nature and concentration of the contaminants. Plant survival and growth are essential parameters in monitoring the effectiveness of phytoremediation protocols for brownfields decontamination. The objectives of this study were to identify which cultivars had the highest yields, and to determine whether the origin of the cuttings (cuttings taken from mother plants growing in contaminated or in a uncontaminated soil) influences survival, growth and phytoextraction potential (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) of willow cultivars when grown on polluted soil. Survival, growth and phytoextraction were compared for ten willow cultivars planted in a highly organic-contaminated industrial environment versus in uncontaminated soil. Variations in cultivar response according to cutting origin (contaminated site or not) were also analyzed for each site. Results show that, *Salix nigra* '5005' was very productive in an extremely contaminated environment. *Salix eriocephala* 'S25' also performed exceptionally well, as it produced large root biomass (nearly twice that the other cultivars). The highest concentration of cadmium was found in *S. x dasyclados* 'SV1'. Cultivars *S. purpurea* x *S. miyabeana* 'Millbrook' and *S. eriocephala* 'S25' exhibited the highest concentrations of chromium. Cultivar 'S25' was also the most effective at concentrating copper, and *S. miyabeana* 'SX67' was the most efficient at phytoextracting zinc. The origin of the cuttings did not have a significant influence on survival, growth or phytoextraction, except for 'Millbrook': individuals originating from the contaminated environment produced significantly more aboveground biomass when grown in a contaminated environment, compared to individuals who had never been in contact with contaminants. These results could help build more effective phytoremediation protocols for highly contaminated environments by identifying willow cultivars and cutting selection techniques appropriate for specific environments

Introduction

Willows are considered ideal candidates for use in phytoremediation due to their physiological characteristics: rapid establishment (Greger and Landberg, 1999), high transpiration rate (Trapp and Karlson, 2001), high tolerance of pollutants (Kukovkina and Volk., 2009) and ability to resprout following coppicing (Labrecque and Teodorescu, 2003; Labrecque and Teodorescu, 2005). Willows are also a valuable perennial species for growers, producing biomass over several growing seasons (Pitre et al., 2010).

Many studies have compared the performance of several willow cultivars facing contamination and the consequences of this stress on their physiology. Willows can live even in the presence of high concentrations of contaminants without a negative impact on growth. For example, *Salix alba* can easily tolerate up to 1000 mg/kg of diesel in a hydroponic environment without a noticeable decline in water transpiration rate (Trapp et al., 2001). It has also been shown that willows can tolerate up to 7.5 mg/L of chromium (Yu and Gu, 2007) and more than 100 μ M of cadmium in a hydroponic environment (Cosio et al., 2006). Despite the fact that willows are highly tolerant to contamination, there is a limit beyond which toxic effects can be observed. Leaf necrosis (Trapp et al., 2001; Cosio et al., 2006; Bialowiec and Randerson, 2010), slower growth (Trapp et al., 2000), decreased transpiration rate (Larsen et al., 2005; Ucisik and Trapp, 2008), leaf chlorosis and even death (Yu et al., 2005) have been observed under extreme conditions.

Different willow cultivars can be used in phytoremediation assays (Tharakan et al. 2005). Cultivars originating from *Salix miyabeana* ('SX61', 'SX64' and 'SX67') (Labrecque and Teodorescu, 2005; Tharakan et al., 2005; Grenier et al., 2015) produced high amounts of biomass in non-contaminated soils in various areas of southern Quebec.

In a moderately contaminated environment, 'SX61' maintained high biomass yields, but 'SX67' seemed more affected by contaminants. *Salix nigra* '5005' was not as productive as the *S. miyabeana* cultivars, but remains a potential candidate for use in phytoremediation, because it produces almost equal amounts of biomass whether planted in healthy or moderately contaminated environments (Grenier et al., 2015).

Brownfields are lands on which soil is highly contaminated due to past industrial activities and waste. Although brownfields are common in urban areas, they often remain vacant due to land-use regulations. Implementation of large-scale phytoremediation projects can represent an advantageous, low-cost method for rehabilitating such land. To our knowledge, the physiological response of willows growing in highly contaminated environments (concentration of several thousands of mg/kg of petroleum hydrocarbon) is poorly documented. Willow survival and growth in some types of contaminated soils has been assessed (Vyslouzilova et al., 2003; Guidi Nissim et al., 2013; Grenier et al., 2015), but crucial information about willow physiology in such environments is still lacking. For example, we do not know which willow cultivars have better survival, growth and phytoextraction rates in highly contaminated industrial brownfields.

Nor do we know whether the exposure of willows to contaminants can eventually influence their capacity to grow in such environment. Many researchers have shown that plants can acclimate to a contaminated environment through the mechanism of phenotypic plasticity (Bossdorf et al., 2008). In this case, the plants adjust their phenotype according to the environmental conditions (Bossdorf et al., 2008; Mousseau et al., 2009). One of the processes involved in phenotypic plasticity is epigenetics (Rival et al., 2010) where the growth conditions to which an individual is exposed can induce

variations in gene expression and function, without altering the DNA sequence (Bossdorf et al., 2008). These variations can be caused by the methylation or acetylation of the DNA (Bird, 2002), that will lead to the activation or inhibition of the activity of the targeted genes that regulates protein expression (Bossdorf et al., 2008; Holliday, 2006; Rival et al., 2010).

Other researchers also analyzed plant tolerance to environmental stresses, but in terms of a typical evolution, *i.e.* where changes in allele frequencies occur among individuals within populations over time. This adaptation differs from the concept of phenotypic plasticity, where no modifications to the DNA sequence are involved. For example, the adaptive potential of plants was studied in mining environments in the mid-20th century, a period during which mineral exploitation increased considerably (Gregory et Bradshaw, 1965; Wu et Bradshaw, 1972; Antonovics, 1975). These studies showed that some herbaceous plants can adapt to inorganic contaminants in a soil heavily contaminated with trace elements. Plants that were used to the contaminated environment became more productive and tolerant in the presence of contaminants, compared to “natural” individuals (*i.e.* those that were never in contact with the contaminant).

This concept and this type of experiment, which compares, in a contaminated environment, the productivity of "normal" individuals to that of individuals accustomed to contaminants could be interesting to analyze from the perspective phytoremediation, involving phenotypic plasticity rather than a typical adaptation (Bird, 2002; Bossdorf et al., 2008; Rival et al., 2010).

In the present study, we assessed biomass production, survival rate, and phytoextraction capabilities in regard to six trace elements (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn) in

ten willow cultivars originating from a highly contaminated site previously occupied by a petrochemical plant, and compared their performance to that of individuals of the same cultivars originating from a non-contaminated environment. For willows growing on the contaminated site, we expected higher biomass production, survival rates and phytoextraction capabilities from cuttings originating from contaminated soil. Among the selected cultivars, we expected 'SX61' and '5005' to display the highest survival rate and biomass yield in the contaminated environment, since this pattern was previously observed in a slightly contaminated environment (Labrecque and Teodorescu 2005; Tharakan et al., 2005; Grenier et al., 2015).

Materials and methods

Study site

The study site is located south of Montreal, Québec, Canada (45.69 N, -73.43 W), along the St. Lawrence River. On average, the area receives 954 mm of precipitation annually (*i.e.* 167 mm of snow and 767 mm of rain) (Guidi Nissim et al., 2013) and the average annual temperature is 6.4 °C (Labrecque and Teodorescu, 2005). The experiment was set up on the site where Pétrumont and Co. LP. previously engaged in primary petrochemical activities as a major producer of low-density polyethylene in Canada. The plant was shut down in 2008 and the site was converted to experimental soil rehabilitation activities.

The decantation basins (45mx35m) used by Pétrumont and Co. LP. to hold wastewater generated during petrochemical activities were emptied in 2008, and the bottom of one of these basins, composed of industrial waste, was used for this

experiment. Several studies have described this site previously (Desjardins et al., 2014; Bell et al., 2014; Cloutier-Hurteau et al., 2014; Grenier et al., 2015). Briefly, this soil contains a mixture of contaminants including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), petroleum hydrocarbon (HPs), oils, and many trace elements (Table 1). Despite these extremely contaminated conditions, a native vegetation cover has been able to establish in parts of the basins (Desjardins et al., 2014) and a willow plantation was set up there by our research group in 2011.

Table 1: Soil characteristics of the contaminated and uncontaminated sites.

Organics contaminants	Soil origins		units
	Contaminated	Uncontaminated	
PAHs			
Total	572.73 ± 1065.21	< 0.20	mg/Kg
HPs			
C10-C50	5792.00 ± 7539.12	< 100.00	mg/kg
Trace elements	Soil origins		units
	Contaminated	Uncontaminated	
Cu	53.10 ± 32.88	0.43 ± 0.04	mg/kg
Cr	135.35 ± 37.56	0.45 ± 0.04	
Ni	65.80 ± 4.42	0.12 ± 0.01	
Pb	19.30 ± 14.47	0.010 ± 0.001	
Zn	133.90 ± 59.41	0.06 ± 0.02	
Cd	0.65 ± 0.01	0.0020 ± 0.0004	
Soils properties	Soil origins		units
	Contaminated	Uncontaminated	
Cation exchange capacity	29.77	24.60	c mol (+)/kg
pH	7.43	6.65	
Organic matter content	5.65	6.10	%

Modified from:
Desjardins et al., 2014; Grenier et al., 2015; Bell et al., 2014; François Courchesne (personnal email communication); Hurteau-Cloutier et al., 2014

Experimental design layout

In May 2014, a reciprocal transplant experiment was established on the former petrochemical site, using ten willow cultivars (Table 2). Willow cuttings used in the experiment originated from a four-year-old plantation growing in the highly contaminated basin (*i.e.* “contaminated” origin) and from a non-contaminated area, located about 200 meters apart. Cuttings from both origins were planted in the contaminated basin and in the adjacent non-contaminated area, resulting in four treatment combinations: i) cuttings from the contaminated basin planted in the contaminated basin; ii) cuttings from the contaminated basin planted in the non-contaminated area; iii) cuttings from the non-contaminated area planted in the contaminated basin; and iv) cuttings from the non-contaminated area planted in the non-contaminated area.

Table 2: Willow (*Salix* spp.) cultivars used in the project

Name	Species	Origin	Characteristics
‘SX67’	<i>Salix miyabeana</i>	Asia	High biomass production
‘SX61’	<i>Salix miyabeana</i>	Asia	
‘5069’	<i>Salix acutifolia</i>	Europe	
‘5044’	<i>Salix alba</i>	Europe	
‘5027’	<i>Salix viminalis</i>	Europe	
‘Fish Creek’	<i>Salix purpurea</i>	North America	
‘Millbrook’	<i>Salix purpurea</i> X <i>Salix miyabeana</i>	Hybrid	
‘5005’	<i>Salix nigra</i>	Canada	Indigenous species
‘S25’	<i>Salix eriocephala</i>	Canada	
‘SV1’	X <i>Salix dasyclados</i>	Canada	

The experimental design comprised four blocks in the contaminated area and four blocks in the non-contaminated area. Each block included the ten cultivars from each origin, randomly distributed (Figure 1). Each block was composed of twenty (20) 1 m² plots (10 cultivars X 2 origins). A total of 640 willow cuttings were used: 320 in the non-contaminated area (160 from the contaminated site and 160 from the non-contaminated site) and 320 in the contaminated area (160 from the contaminated site and 160 from the non-contaminated site).

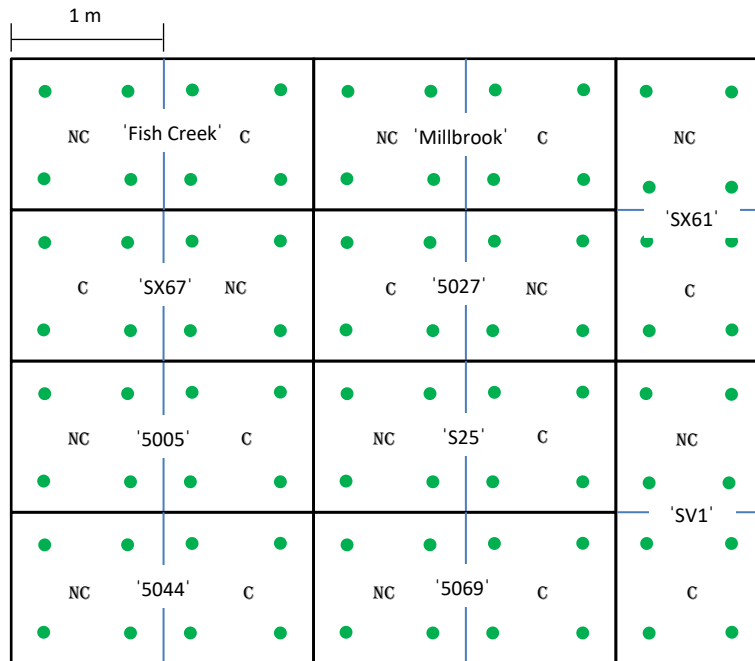


Figure 1. Schematic representation of an experimental block. Each circle represents an individual cutting. All ten cultivars (see Table 2 for the list of cultivars) were planted in each block with four cuttings originating from the contaminated site (C) and four cuttings originating from the non-contaminated site.

The cuttings used in the study were harvested during the spring of 2014, before bud break. Cuttings, 5-10 mm in diameter and 23-25 cm in height, were stored at 4 °C until planting. They were soaked in distilled water for 24 hours just prior to planting, then

planted 50 cm apart on May 22, 2014, in the contaminated basin, and on May 27, 2014, in the non-contaminated area, with only 5 cm of the cutting above ground. Plots were weeded manually every week during two consecutive growing seasons. Coppicing was required on both experimental sites before the beginning of the second season. Consequently, the trees had two-year root systems and one-year stems during final sampling.

Sampling and measurements

In the contaminated basin, an exhaustive survey of all surviving willows was conducted and morphological parameters (height, number of stems and diameter of the main stem) were recorded at the end of the two summer. Aboveground and root biomass was harvested at the end of the second growing season. Aboveground biomass was oven dried at 70°C for ten days and weighed. Roots were delicately cleaned with water, air dried in a greenhouse for three weeks and then weighed. In the non-contaminated area, growth measurements were taken on one plant for each cultivar and origin combination in each block, and the same process was followed for morphological parameters.

Phytoextraction

Phytoextraction capability was measured only on the plants growing in the contaminated basin. For each cultivar and origin combination, two samples were considered in each block. The selected cuttings were cleaned with distilled water, dried in an oven, and then ground to a 0.4 mm powder. Trace elements were quantified using the

method described in Courchesne et al. (2017). For each sample, 0.2 g of the powder was mixed with 2 mL of nitric acid (HNO₃) 70% for at least 12 hours. Samples were processed on a digestion block at 120°C for 5 hours. After the digestion process, samples were diluted with pure water to obtain a volume of 50 mL of HNO₃ 4% solution. Solutions were filtered, diluted 2X and analysed through an ICP-MS apparatus to quantify Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn. Chemical analyses were validated by blanks and reference materials (Tomato powder # 1573a, NIST).

Statistical analysis

Morphological parameters, biomass production and phytoextraction were analysed with mixed model ANOVAs in which fixed effects were origin and cultivars, and using JMP_12.2.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) software. The interaction between origin and cultivars has also been analyzed. Statistical analyzes were performed separately for each site (contaminated and non-contaminated), to avoid pseudoreplication. Block was included as a random effect. For each variable, the assumptions of normality of the data and homogeneity of the variance were tested and a logarithmic transformation was applied when required. Post-hoc comparisons were performed using the Tukey HSD test. All effects were considered significant at the standard 5% significance level. Furthermore, frequency analysis using log-linear models was used to assess differences in mortality rate among cultivars.

Results

Survival

The survival rate of plants growing in the non-contaminated soil was >90% for all cultivars (Figure 2A). There was no statistically significant difference in survival between cultivars or origins. In the contaminated soil, survival was considerably lower; on average, there was a 62% survival rate (Figure 2B). The origin of the cuttings did not influence the survival rate, but there were statistically significant differences between cultivars with regard to survival (Figure 2B). Cultivar '5005' (black willow) had the highest survival rate in the highly contaminated area: 96% of the individuals of this cultivar survived (Figure 2B). This cultivar maintained high survival rates in both environments. On the other hand, '5044' and 'SX61' had much lower survival rates in the contaminated basin. For '5044', 19% of the cuttings of contaminated origin survived, compared to 50% for cuttings of the non-contaminated origin. Survival rates were 25% and 44% respectively for 'SX61' (Figure 2B).

Due to low survival rates, cultivars '5044', 'SX61' and 'Fish Creek' growing in the contaminated soil were excluded from further analyses. Each had survival rates \leq 50% and did not have at least one living individual per origin and block.

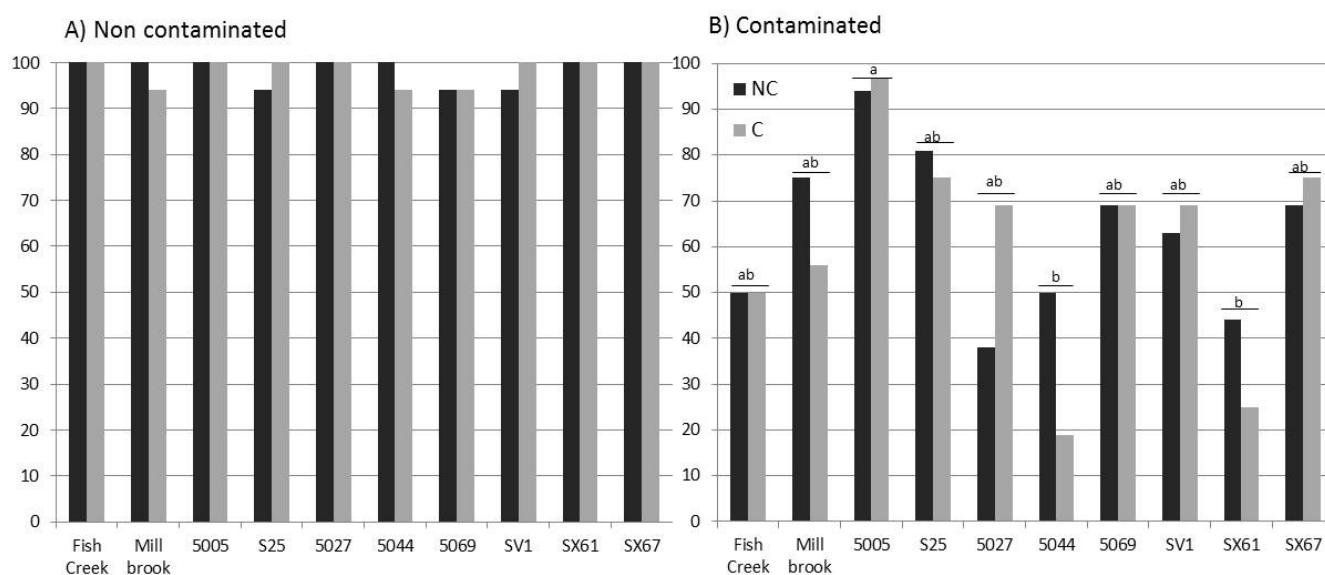


Figure 2. Mean survival (%) of ten willow cultivar growing in the non-contaminated (A) and the contaminated (B) environment. Black bars represent cuttings originating from the non-contaminated site. Grey bars represent cuttings originating from the contaminated site. Means values are presented with standard deviations. Different lowercase letters indicate statistically significant differences among cultivars. Data were analyzed by frequency and represented as a percentage.

Biomass

Cultivars growing in the non-contaminated area produced 117.5 g of aboveground biomass per individual on average after one growing season. There were statistically significant differences between cultivars with regard to biomass ($p=0.0002$). Cultivars 'SX61' and 'SX67' produced significantly more aboveground biomass than '5005', '5027' and '5069' (Figure 3a). The average aboveground biomass of the latter cultivars was 82.9 g, roughly half that of 'SX61' and 'SX67', which reached an average biomass of 163.9 g. The origin of the cuttings did not have a significant impact on aboveground biomass when plants were grown in the non-contaminated soil.

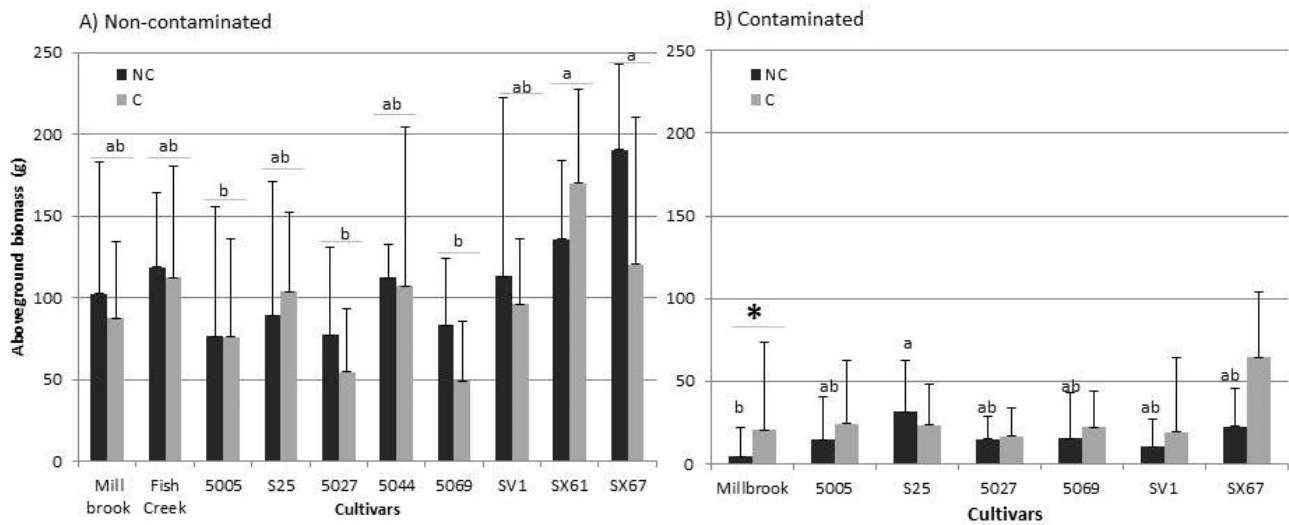


Figure 3. Aboveground biomass of ten and seven willow cultivars growing in the non-contaminated (A) and the contaminated (B) environment respectively. Black bars represent cuttings originating from the non-contaminated site. Grey bars represent cuttings originating from the contaminated site. Means values are presented with standard deviations. In A, different lowercase letters indicate statistically significant differences among cultivars. In B, Different lowercase letters indicate statistically significant differences among cultivars originating from the non-contaminated area. Asterisks indicate a significant effect of origin within cultivars.

In the contaminated soil, willows produced, on average, one-third the aboveground biomass of those in the non-contaminated area after one growing season: the average aboveground biomass produced by cultivars growing in contaminated soil was 36.4 g (Figure 3B).

For the contaminated site, the ANOVA results suggest that the provenance is significant (Supplementary file 1). Perhaps, the interaction between cultivar identity and origin of the cuttings was also significant ($p=0.04$), suggesting that cultivars did not respond in the same way to the origin factor. The origin of the cuttings influenced aboveground biomass only for 'Millbrook' ($p=0.03$). For this cultivar, individuals from the contaminated area produced significantly more aboveground biomass (39.7 g) than

those that were not previously grown in the contaminated area (14.1 g). For the other six cultivars, the origin of the cuttings was not significant, although marginally significant for '5005' ($p=0.07$). Furthermore, in the contaminated soil, for each cultivar cuttings originating from the contaminated area tended to produce more aboveground biomass on average, except for 'S25', in which the opposite trend was observed, although such trends were generally not significant (Figure 3b).

Moreover, still in the contaminated site, when we analysed the data of the individuals originating from the contaminated area only, we did not detect any significant difference between cultivars in regard to aboveground biomass production. However, results for only the individuals originating from the non-contaminated area, revealed significant differences between cultivars. 'S25' produced significantly more aboveground biomass (56.7 g) than 'Millbrook' (14.1 g), on average ($p=0.04$).

Results for belowground biomass tended to be relatively similar to those for aboveground biomass, but with a few distinctions. Root biomass was analysed only in the contaminated environment. The destructive sampling (i.e. excavation) of the trees was not possible in the non-contaminated area because the trees have to be maintained for long-term monitoring. Cultivars produced 22.9 g of aboveground biomass per individual on average after one growing season (Figure 4). The origin of cuttings was not significant ($p=0.10$). There were significant differences between the seven cultivars in term of root biomass ($p=0.006$). Cultivar 'S25' produced the most root biomass in the contaminated environment, with 43.4 g per cutting. 'Millbrook', '5027', '5069' and 'SV1' produced significantly less root biomass with 16.9 g, 14.9 g, 17.2 g and 16.2 g respectively.

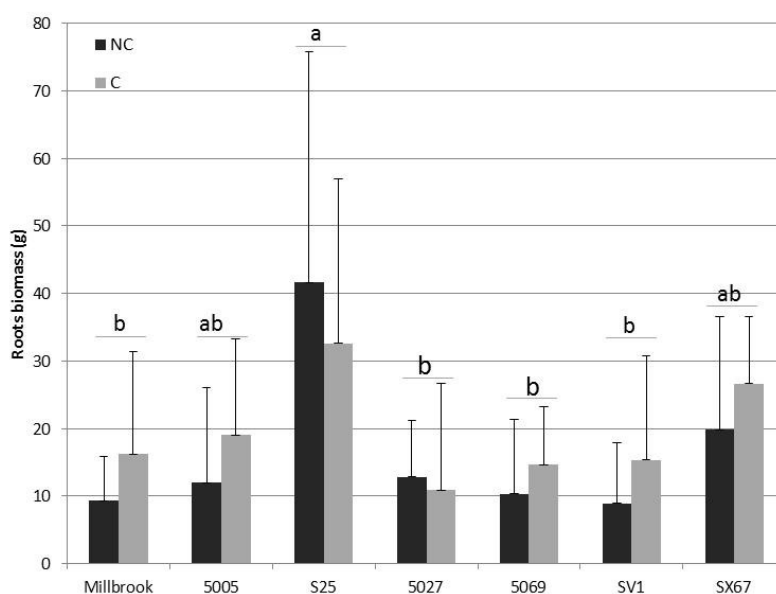


Figure 4. Belowground biomass of seven willow cultivars growing in the contaminated environment. Black bars represent cuttings originating from the non-contaminated site. Grey bars represent cuttings originating from the contaminated site. Means values are presented with standard deviations. Different lowercase letters indicate statistically significant differences among cultivars.

Phytoextraction

The capacity of willows to concentrate trace metals (notably Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) in their aboveground parts was investigated for the contaminated experimental site (Figure 5). The origin of the cuttings did not significantly influence the ability of the willow to concentrate any of the six metals in the tissues. The average trace element concentrations found in the biomass were 114.3 mg of Zn / kg, 11.0 mg of Cu / kg, 5.8 mg of Ni / kg, 3.5 mg of Pb / Kg, 3.2 mg of Cd / kg and 0.4 mg of Cr / kg.

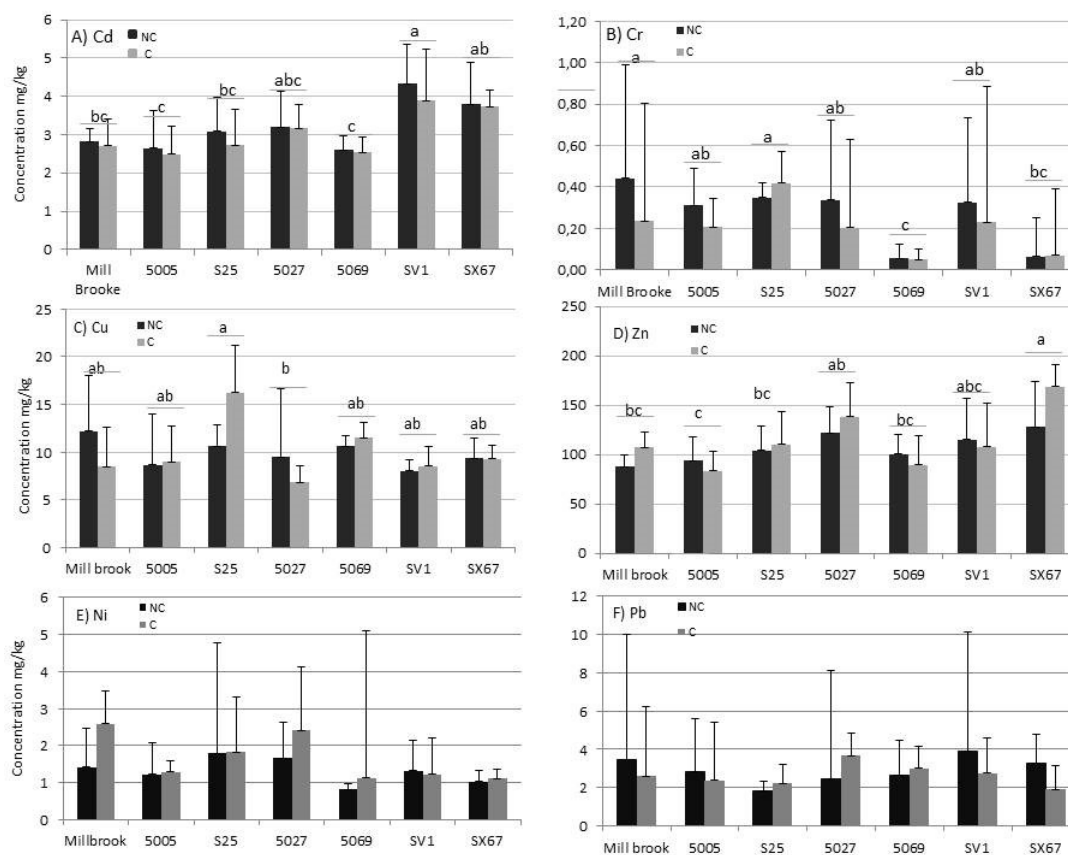


Figure 5. Concentrations of four trace elements (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) in aboveground plant tissues of seven willow cultivars growing in a contaminated soil. Black bars represent cuttings originating from the non-contaminated site. Grey bars represent cuttings originating from the contaminated site. Different lowercase letters indicate statistically significant differences among cultivars regardless of origin.

For nickel and lead, no concentration differences were observed between cultivars (Figure 5E, 5F). All cultivars concentrated similar amounts of these two metals in their stems at a low average of 1.55mg/kg for Ni and 3.45 mg/kg for Pb. For cadmium, chromium, copper and zinc concentration, significant differences were observed between cultivars (Figure 5A-D), which suggests that some cultivars were more efficient than others at extracting trace elements.

For all cultivars, the average amount of cadmium concentrated in the biomass was 3.1 mg/kg. The concentration of cadmium ranged from 2.6 mg/kg to 4.1 mg/kg. 'SV1' accumulated the most cadmium in its stems, with an average concentration of 4.1 mg/kg, much higher than that in '5069' and '5005', which accumulated the lowest cadmium concentration, 2.6 mg/ kg on average (Figure 5A).

The average chromium concentration for all seven cultivars was 0.2 mg/kg and ranged from 0.05 to 0.4 mg/kg. 'S25' and 'Millbrook' showed the highest concentrations of chromium in their aboveground parts with 0.4 mg/kg and 0.3 mg/kg respectively. '5069' and 'SX67' were the least efficient at concentrating chromium. These cultivars accumulated one-fifth the amount of this element in their stems that 'S25' and 'Millbrook' were capable of (Figure 5B).

The average copper concentration for all seven cultivars was 9.8 mg/kg and the quantities ranged from 8.0 to 13.1 mg/kg. 'S25' concentrated most copper in its aboveground parts, with 13.1 mg/kg on average. On the other hand, '5027' was the least efficient with 8 mg/kg on average (Figure 5C).

For zinc, an average of 111.2 mg/kg was measured in the biomass of the seven cultivars. The concentration of zinc ranged from 88.6 to 148.3 mg/kg. 'SX67' concentrated the most zinc in its aboveground parts, with 148.3 mg/kg on average. '5005' was the least efficient, with 88.0 mg/kg on average (Figure 5D).

Discussion

Cultivars

Survival

Contamination influenced the survival rates of the cultivars. Cultivars growing in the contaminated soil generally had lower survival rates. The only cultivar that maintained the same survival rate on both types of sites was '5005' (*Salix nigra*). This result supports our initial hypothesis and is similar to what was observed by Kuzovkina et al., (2004), where *S.nigra* was the most resistant to the presence of copper and cadmium in a hydroponic medium. Taken together, these findings suggest that '5005' would be a recommended candidate for future phytoremediation protocols in extremely contaminated environments.

We expected 'SX61' to be one of the most productive cultivars in both environments, due to its resistance to disease and insect attacks (Labrecque and Teodorescu, 2005) as well as its early-spring growth strategy (Grenier et al., 2015). Production of a large amount of biomass is proportionally related to early bud burst and rapid onset of growth following winter (Weih and Nord, 2002). This characteristic seems to benefit 'SX61' in a slightly contaminated environment, allowing it to maintain a high biomass yield (Grenier et al., 2015). Dos Santos, (2007), also reported that *S. purpurea* 'Fish Creek' was similarly one of the most efficient cultivars in soil contaminated by trace elements, due to its capacity to produce large quantities of biomass and concentrate minerals. However, based on our results, both cultivars had relatively low survival rates and could not be considered relevant candidate for phytoremediation purposes in highly contaminated environments. These two cultivars were very productive in a non-contaminated environment, but their tolerance limits were probably lower than those of

other cultivars. The tolerance limit for contaminants varies between cultivars (Antonovics, 1975). A cultivar known for high biomass production in a non-contaminated environment can also be associated with strong sensitivity to environmental stress: a high biomass yield is not a sufficient criterion for selecting a cultivar in a phytoremediation protocol as this might be related to poor tolerance to contaminants (Weih, 2001).

Aboveground biomass

Cultivars 'SX61' and 'SX67' are known to produce high aboveground biomass yield in non-contaminated environments (Labrecque and Teodorescu, 2005; Kiernan et al., 2003; Tharakan et al., 2005), and this was also the case in our experiment. '5005', '5069', and '5027' produced less biomass on the non-contaminated site. However, '5027' has often been used in phytoremediation studies, and its capacity to produce high biomass yields has been widely highlighted (Greger and Landberg, 1999; Labrecque and Teodorescu, 1997 and 2003). *Salix viminalis* '5027' is targeted by many pest insects (*Plagioderia versicolora* Laicharteg, *Disonycha alternata* Illiger and *Empoasca fabae* Harris (the potato leafhopper)), which could explain its weak biomass production on our study site. Thus, '5027' should not be recommended for phytoremediation assays, at least in southern Québec.

In the contaminated area, aboveground biomass production was relatively similar for all cultivars. Since biomass production and cultivar ranking can vary from one growing season to another (Keller et al., 2003; Labrecque and Teodorescu, 2005) and that contaminants may limit willow growth (Thompson et al., 1998b; Farlane and Pfleeger, 1990; Ma et al., 2013), an additional growth season could be necessary to observe differences between cultivars.

We observed that, in the contaminated environment, the '5005' produced 61.2% less biomass compared to when grown in the non-contaminated environment, rank it among the most effective in resisting the loss of biomass production in a contaminated environment. This compares favourably to 'SX61', '5044' and 'Fish Creek' which produced 85.8% less biomass on average in the contaminated environment than in the non-contaminated environment. Similar results were noted by Grenier et al. (2015), who observed a smaller decrease (12.3%) between a non-contaminated and a slightly contaminated environment for '5005'. This cultivar tends to exhibit increased leaf area in contaminated environments (Grenier et al., 2015). Under stress, certain plants can modify their biomass allocation between different organs as a coping mechanism (Cosio et al., 2005). '5005' allocates more resources to aboveground parts in stressful situations, and this modification in growth strategy may be to its advantage when growing in contaminated areas. Other advantages found in '5005', such as a higher photosynthetic rate, and an optimal transpiration and stomatal conductance were also previously reported by Grenier et al., (2015).

Belowground biomass

'S25' produced almost twice the biomass of the other cultivars in contaminated soil. This characteristic is highly relevant for phytoremediation purposes. This cultivar also ranked second for aboveground biomass, and its survival rate was close to 80%. Such results indicate that 'S25' is a potential candidate for phytoremediation assays. '5027', 'Millbrook', 'SV1', and '5069' produced the least root biomass. These results concur with belowground biomass yields observed in a four-year plantation in the same contaminated basin (unpublished results). The root morphology of these four cultivars also appeared to be unfavourable. The roots of 'SV1' were smaller in diameter, whereas

the roots of '5027' were shorter. 'Millbrook' and '5069' produced roots only on the top third of the belowground portion of the cuttings (unpublished results). All these characteristics lead to lower biomass production.

Phytoextraction

Trace element affinities and absorption capacities vary from one cultivar to another due to intrinsic genotypic variations and according to the nature of the element (Vyslouzilova et al., 2003; Mleczek et al., 2010). The absorption of trace elements depends on the different molecular paths taken by the trace elements (Greger and Landberg, 1999) and the activation of complex defense mechanisms (Drzewiecka et al., 2012); it may also vary according to the plant's evapotranspiration rate (Dos Santos, 2007).

The concentrations of nickel and lead in stems were relatively low, and similar for all cultivars, corresponding to previous results (Labrecque et al., 1994; Bissonnette et al., 2010; Mleczek et al., 2010). Willows are known to have low bioaccumulation factors for nickel (Drzewiecka et al., 2012) and lead (Pitchel et al., 2000, Vyslouzilova et al., 2003, Yang and Ye, 2009).

In our study, the quantity of cadmium found in the aboveground biomass of the willows (3.19 mg/kg) was relatively low. Perhaps, this metal is mobile and soluble (Couehtrev and Martin, 1978; Cosio et al., 2005) and is usually concentrated in larger amounts in biomass (Dos Santos et al., 2007; Fisherova et al., 2006). Willows are even considered highly efficient for cadmium phytoextraction (Klang-Westin and Perttu 2002, Fischerova et al., 2006, Kacalkova et al., 2014), since their translocation factor for this element is high (Zacchini et al., 2009). The low concentrations of cadmium on the contaminated site of our study (0.65 mg/kg), reflecting the "uncontaminated" criterion

required to certify land as such under Quebec legislation (Charter of sustainable development environment and fight against climate change Québec), could explain the low concentrations found in the biomass. Nevertheless, in our research, willows have bioconcentrated almost five times the concentration of cadmium of the soil in their aerial tissues.

Zinc was found in large quantities in the biomass. This was also observed by Roy et al., (2005). Perhaps, bioconcentration (Nissen and Lepp, 1997) and translocation factors (Roy et al., 2005; Roselli et al., 2003) are not as high as those reported for cadmium. 'SX67' concentrated the largest amounts of zinc in its stems, and was selected in a phytoextraction protocol for zinc in Québec's Gaspésie region (Licinio et al., Unpublished study). '5027' also phytoextracted high amounts of zinc; Landberg and Greger (1996) and Vyslouzilova et al. (2003) noted that this cultivar was the most effective for zinc phytoextraction. Dos Santos (2007) obtained the highest level of zinc phytoextraction with 'SV1'. Differences between study sites and the cultivars studied in each of the studies, might explain the different results obtained.

'S25' and 'Millbrook' accumulated the highest concentrations of chromium in their stems. Usually, the majority of this element is found in roots when the soil chromium concentration is low, but as it increases, so does the amount of chromium translocated from roots to stems (Yu and Gu, 2007). These results could explain why a small concentration of chromium was found in the aboveground parts (0.37 mg/kg) of individuals growing on soil with a low level of chromium contamination (135 mg/kg).

'S25' was the most efficient and '5027' the least efficient at phytoextracting copper. Other researchers have also observed that '5027' had the lowest concentrations of

copper in its biomass (Nissen and Lepp, 1997). Therefore, this cultivar is not recommended for copper phytoextraction.

Origin effect

Classical common garden experiments, analyzing the adaptation of plants in contaminated soil, concluded that plants can evolve and become more tolerant to pollutants. Indeed, individuals who had grown for several generations in a contaminated soil were significantly more productive, in this environment, than individuals of the same species sampled in a healthy environment (Jowett, 1964; Gregory 1965; Antonovics et al., 1971; Wiltshire, 1974; Antonovics et al. 1975). These results were based on a usual adaptation, which involves changes in the allelic frequency throughout the generations. Here, we tested this hypothesis, but from the point of view of phenotypic plasticity, in a phytoremediation experiment, where cuttings are taken from mother plants to build the plantations.

In our study, very few effects of the origin of cuttings were noted. Based on our results, we cannot conclude that cuttings originating from a mother plant in a contaminated soil similar to the one we used, have an advantage when planted in a contaminated site. In the uncontaminated environment, origin was non-significant for all cultivars. In the contaminated environment, the origin of the cuttings did not influence survival, phytoextraction, root biomass production or aboveground biomass production for six of the seven cultivars studied. However, a significant effect was observed for 'Millbrook': individuals from the contaminated environment produced significantly more aboveground biomass in a contaminated environment compared to individuals from the

non-contaminated environment. This effect could be explained by several factors. Epigenetic changes may be involved (Rival et al., 2010), making it easier for the plant to tolerate such a stressful environment (Holliday, 2006).

In addition, although the differences in above ground biomass were non-significant, mean biomass for the individuals from the contaminated environment (43.2 g) tended to be higher than the mean biomass for the individuals from the uncontaminated environment (29.6 g). Origin effect was significant (supplementary file 1), although siteXgenotype interaction was also significant: each cultivar would respond specifically to contamination. In general, individuals from the contaminated environment were equivalent to individuals from the uncontaminated environment for all parameters and on both study sites. The differences between our results and those of previous studies (Jowett, 1964; Gregory 1965; Antonovics et al., 1971; Wiltshire, 1974; Antonovics et al. 1975) can be explained in several ways. First, there are major differences between the study sites involved.

First, the two mechanisms involved in the studies (phenotypic plasticity and adaptation) are not governed by the same processes. As we worked with cultivars, with only one generation, phenotypic plasticity would have been responsible for the differences observed. One hypothesis would be that contamination may eventually lead to an adaptation in plants after several generations, but it does not activate epigenetic change strong enough to observe differences between the two types of individuals. These epigenetic changes may have been present, but they were too weak to counteract the impact of contamination as high as our study site.

Also, researchers who found that cutting origin had a significant effect were working with soils contaminated by trace elements. On our site, trace elements were present, but in lower concentrations. It may be difficult to study plant's response to metals in an environment where trace element concentrations are relatively low, since this response can be very slow and/or camouflaged by the "noise" of other local adaptations or other individual genetic variations (Antonovics 1975). On our site, the contamination was mainly petroleum hydrocarbons. These contaminants may have less to do with the plant's genetics than inorganic contaminant, naturally present in the environment. Plants probably initiate less epigenetic mechanism facing organic contaminants than trace elements, making it difficult to develop an acclimation to these contaminants.

In addition, since the contamination was extremely high, defense mechanisms against contaminants may have been activated in plants, limiting growth (Drzewiecka et al., 2012), and thus decreasing differences in biomass production between origins. Moreover, the authors mentioned above studied the acquisition of tolerance in herbaceous plants. The acquisition of contaminant tolerance depends on the sensitivity of the species and is species-specific (Gregory, 1965). Willows could potentially be less able to develop this tolerance. However, because they can maintain high biomass yield in contaminated environments (Greger and Landberg, 1999; Trapp and Karlson, 2001), it could also be hypothesized that willows have an innate tolerance to contaminants.

Since tolerance to metal contamination is dependent on time and metal concentration (Wu and Bradshaw 1972), four growing seasons may have not been sufficient to allow the mother plant to develop epigenetic markers strong enough to

enable it to tolerate such extreme contamination. In addition, our experiment took place over a short period of time, on a single generation on one-year aboveground biomass and over two growing seasons. A monitoring over only one growing season (because of the coppicing) may not be enough to observe differences between the two types of cuttings. These constraints may explain the absence of difference between origins.

Our results show that the use of willow cuttings that originated from a contaminated environment is not necessarily advantageous for phytoremediation purposes. On the other hand, willows grown in an environment heavily contaminated with organic pollutants were not at a disadvantage and there is no reason to limit their use in phytoremediation projects. Since coppicing does not reduce survival and is advantageous for the long-term growth of willows (Labrecque and Teodorescu, 2003; Labrecque and Teodorescu, 2005), several phytoremediation researchers have elected to coppice annually. This biomass generated could thus be used and planted on another site for phytoremediation or other purposes.

Conclusion

Survival, growth and phytoextraction capability were analyzed for ten willow cultivars in an environment contaminated mainly by organic compounds versus an uncontaminated environment. The influence of the origin of cuttings (originating from a contaminated or a non-contaminated area) was also assessed on both sites.

We noted that willows maintained relatively high survival rates, even in the extremely contaminated environment. '5005' seemed to be the cultivar least influenced by contaminants. 'S25' would be another appropriate candidate for phytoremediation

protocols due to its high rate of root biomass production. It is interesting to note that these two cultivars are doubly advantageous, since they are also indigenous to Canada. Furthermore, 'S25' and 'SX67' produced the largest aboveground biomass in the contaminated basin.

Based on our results, it is possible to conclude that the origin of willow cuttings seems to have no major effect on willow growth and phytoextraction capability in an environment that is heavily contaminated with organic compounds. It is possible that, in the contaminated environment, the origin of the cuttings influences the production of aerial biomass for the cultivar 'Millbrook'. Individuals from a contaminated environment seem to produce more aboveground biomass in this environment than individuals from a non-contaminated environment. A multi-generational study would be needed to analyse the long-term effects of cutting origin on willow growth in soils heavily contaminated by organic compounds, but also by inorganic compounds, following the example of Jowett, (1964), Gregory (1965), Antonovics et al., (1971) and Wiltshire (1974). It would also be interesting to increase our understanding of the priming effect and defense mechanisms activated by contamination, as well as to investigate whether epigenetic play a role in subsequent adaptation.

Acknowledgement

Our thanks to Stéphane Daigle for assistance with statistical analysis, Karen Grislin for critical revision of the manuscript, Maxime Fortin Faubert for many helpful suggestions, and to the numerous individuals who assisted in biomass harvesting and measurement of physiological parameters. We would also like to thank Pétromont

Société en Commandite for providing access to the experimental site. This study was funded by Genome Canada and Genome Québec, within the GenoRem project.

Supplementary

Supplementary file 1. Result of a two way ANOVA perform on the contaminated site for the aboveground biomass

Source	p-value
Cultivar*provenance	0,03928
provenance	0,04583
Cultivar	0,16483

Discussion

Effet cultivars /milieu non-contaminé

En une saison de croissance suite au recepage, les cultivars issus de *Salix miyabeana* (SX61 et SX67) ont produit significativement plus de biomasse aérienne (160.32 g et 167.44g respectivement) en milieu non-contaminé, que les autres cultivars (Figure 3a). Ces cultivars ont d'ailleurs démontré leur fort potentiel de production de biomasse dans plusieurs autres études (Labrecque et Teodorescu, 2005; Kiernan *et al.*, 2003; Tharakan *et al.*, 2005). Labrecque et Teodorescu (2005) ont aussi avancé que, bien que les cultivars 'SX61', 'SX64' et 'SX67' produisaient significativement plus de biomasse aérienne que les autres cultivars quatre ans après la plantation, c'était plutôt le 'S25' qui avait une productivité maximale suite à la première saison de croissance. Dans d'autres études en milieux non-contaminé, c'est plutôt le cultivar 'SV1' qui obtient le meilleur rendement en termes de production de biomasse (Kopp et al., 1997; Grenier et al., 2015). Sur notre terrain, ces deux cultivars ('S25' et 'SV1') ont eu des rendements moyens, sans plus. Il se pourrait qu'ils soient très spécifiques dans leurs préférences en matière de sol, ce qui expliquerait des rendements si variables entre les études. Par ailleurs, cette variabilité pourrait aussi être expliquée par la présence d'insectes ravageurs (*Plagiodera versicolora* Laicharteg et *Disonycha alternata* Illiger) qui broutent spécifiquement le cultivar 'SV1' et qui aurait pu nuire à sa croissance (Labrecque et Teodorescu, 2005). De plus, des différences dans les caractéristiques pédologiques des sols des différentes études ou des variations climatiques annuelles pourraient expliquer les résultats divergents entre les études.

Effet cultivars / Milieu contaminé

Dans le milieu contaminé, la biomasse aérienne produite par tous les cultivars, toutes provenances confondues, est relativement la même. Il serait intéressant d'analyser les différences qui s'établiraient entre les cultivars sur plus d'une saison de croissance. En effet, le rendement et le classement des cultivars peuvent varier d'une saison de croissance à l'autre (Labrecque et Teodorescu, 2005). De plus, la contamination peut affecter la croissance des saules (Ma et al., 2013; Dietz et Schnoor, 2001; Cosio et al., 2006) et certains cultivars nécessitent peut-être plus de temps pour se démarquer.

Selon Grenier et al. (2015), le cultivar 'SX61' est l'un des plus efficaces en milieu moyennement contaminé, alors que le cultivar 'SX67' est plus affecté par la contamination, puisque sa production de biomasse chute radicalement en présence des contaminants du sol à l'étude. Nous avons pourtant observé le contraire en milieu fortement contaminé : le cultivar 'SX61' a eu les taux de survie les plus bas, alors que le cultivar 'SX67' produisait une biomasse aérienne semblable à celle de tous les autres cultivars ayant survécu dans le bassin. Bien que les différences n'étaient pas significatives, le cultivar 'SX67' avait même la plus haute moyenne de biomasse produite enregistrée dans le bassin. Les différents résultats pourraient être expliqués par les différences entre les sites d'études. En effet, sur le présent site, il y a jusqu'à 10 000 fois plus de HAP et 3 fois plus de C10-C50 que sur le site utilisé par Grenier et al. (2015). Il est possible que, lorsque le 'SX61' survit dans un milieu contaminé, il y soit le plus productif, mais qu'il possède aussi un seuil de tolérance à la contamination plus faible comparativement aux autres cultivars. En effet, un clone connu pour une forte production de biomasse en milieu sain peut aussi être relié à une forte sensibilité aux stress

environnementaux (Weih, 2001). Ces résultats devraient être pris en considération lors de l'élaboration d'un futur projet de phytoremédiation.

Le cultivar '5005' a obtenu un taux de survie de 97% dans le milieu contaminé, ce qui est très remarquable, vu la contamination extrême. Parmi les cultivars à l'étude, ce cultivar semble être celui le moins affecté par la contamination. C'est d'ailleurs ce qui avait été observé par Grenier et al. (2015) lors de la comparaison des productivités de onze cultivars entre un milieu sain et un milieu moyennement contaminé. Dans cette étude, le cultivar '5005' produisait une quantité de biomasse semblable entre le milieu non-contaminé et le milieu moyennement contaminé. Nous avons aussi observé que la production de biomasse de ce cultivar diminuait de 61.9% lorsqu'il était planté dans le milieu contaminé, en proportion de ce qu'il avait produit dans le milieu non-contaminé. Parmi les cultivars à l'étude, il est donc le cultivar ayant le moins diminué sa production de biomasse entre les deux milieux. Malgré le fait qu'il ne produise pas les plus grandes biomasses en milieu non-contaminé, sa production de biomasse est équivalente à celle des autres cultivars en milieu extrêmement contaminé et son fort taux de survie garantit une production de biomasse bien répartie à travers la plantation. Ce cultivar devrait être valorisé dans les protocoles de phytoremédiation en milieu extrêmement contaminé.

Un aspect très important de notre étude est l'analyse de la production de biomasse racinaire des saules dans un milieu extrêmement contaminé. Le cultivar 'S25' a produit, en deux ans, une biomasse racinaire doublant celle des autres cultivars. Il s'agit d'une caractéristique très intéressante dans une optique de phytoremédiation. De plus, le 'S25' a produit une biomasse aérienne semblable à celle des autres cultivars en milieu fortement contaminé et ses taux de survie se situaient autour de 80%, ce qui est excellent.

Bref, pour de futurs projets de phytoremédiation en milieu fortement contaminé semblable à celui de la présente étude, nous recommandons de valoriser le cultivar ‘5005’ pour la survie exceptionnelle, et le cultivar ‘S25’, qui présentait également un bon taux de survie, mais surtout une forte production de biomasse racinaire pouvant favoriser une meilleure décontamination. Il est très intéressant de noter que ces deux cultivars sont indigènes au Québec, ce qui constitue un avantage intéressant à l’égard de préoccupations écologiques.

Effet origine

Par la plasticité phénotypique, les plantes peuvent accumuler des modifications phénotypiques (sans modification à la séquence d’ADN) leur permettant de mieux faire face aux variations environnementales de leur milieu (Bossdorf et al., 2008; Mousseau et al., 2009). Ces modifications peuvent aussi se transmettre d’une génération à l’autre, et ce, même en l’absence du stimulus (Fieldes et Amyot, 1999; Latzel et al., 2014; Mousseau et al., 2009). C’est ce qu’on appelle la plasticité transgénérationnelle, où les individus héritent de l’acclimatation subie par leur plante mère. D’un autre côté, les plantes peuvent aussi s’adapter à leur milieu grâce à une adaptation typique : c’est-à-dire où des modifications à la séquence d’ADN sont impliquées (Jowett, 1964; Gregory 1965; Antonovics et al., 1971; Wiltshire, 1974). Jowett (1964), Gregory (1965); Antonovics et al., (1971) et Wiltshire (1974) ont montré que des individus poussant depuis plusieurs générations sur un sol contaminé en élément trace étaient plus tolérants à ces contaminants que d’autres individus de la même espèce n’ayant jamais été en contact avec les éléments traces. Leur théorie était intéressante à tester sous l’angle de la

phytoremédiation, impliquant les mécanismes de plasticité phénotypique. Les résultats d'une telle étude pourraient indiquer s'il est avantageux ou non de prélever les boutures utilisées dans les dispositifs de phytoremédiation sur des plantes mères poussant en sols contaminés.

Pourtant, notre étude nous a permis de conclure que, dans un milieu fortement contaminé et en une saison de croissance, presque aucune différence n'a été observée entre les deux types d'individus (boutures provenant d'une plante mère en milieu contaminé ou d'une plante mère en milieu non-contaminé). Plusieurs facteurs pourraient expliquer les différences entre nos résultats et ceux des chercheurs travaillant en milieux miniers. Les différents types de contaminants et les différents mécanismes en jeu (adaptation typique vs. plasticité phénotypique) peuvent amener des variations dans les résultats. Aussi, l'ampleur de la contamination sur notre site a pu empêcher l'observation de l'acclimatation des saules. Dans ce cas, les réponses épigénétiques seraient trop faibles pour contrer un stress aussi important et sont camouflées par le «bruit» de la contamination. De plus, les boutures ont été prélevées sur des plantes mères ayant poussé en présence des contaminants pendant quatre ans. Il est possible que cette durée ne soit pas suffisante pour induire des changements significatifs, ou au contraire, que cette période ait été suffisante à la décontamination du sol par les saules, entraînant la disparition des marqueurs épigénétiques dû à la contamination.

L'effet de la provenance a été significative pour le cultivar 'Millbrook'. Pour les six autres cultivars, la provenance des boutures n'était pas significative, bien que marginalement significative pour '5005' ($p=0.07$). Il est possible que les variations épigénétiques fussent présentes chez tous les cultivars, mais pas suffisamment fortes pour

être perçues face aux répercussions d'une contamination extrême. Une suite à notre étude serait de tester l'hypothèse de départ dans un sol présentant une contamination organique plus faible. Toutefois, pour l'instant, rien ne semble indiquer qu'il soit avantageux de prélever les boutures dans un milieu contaminé. D'un autre côté, l'utilisation de boutures prélevées sur des plantes mères en milieu contaminé n'est pas non plus un désavantage: la biomasse récupérée après les recépages peut donc être utilisée dans de futur protocole de phytoremédiation sans problèmes.

Conclusion générale

Nous avons comparé les rendements (survie, biomasse, phytoextraction) de dix cultivars de saules en milieu non-contaminé et en milieu fortement contaminé, dans un sol composé de déchets industriels. Comme les plantations de phytoremédiation sont souvent mises en place en utilisant des boutures prélevées sur des plantes mères, nous avons aussi observé s'il était avantageux d'échantillonner ces boutures en milieu contaminé. En effet, les plantes peuvent s'acclimater à leur environnement (Bossdorf et al., 2008; Mousseau et al., 2009). Dans ce cas, la plante mère porterait des marqueurs épigénétiques qui pourraient avantager la survie et/ou la croissance des boutures plantées dans le même type de milieu à des fins de phytoremédiation.

Les saules sont très résistants à la contamination. Sur un site fortement contaminé par les contaminants organiques, des saules plantés directement dans les résidus industriels d'une industrie pétrochimique ont réussi à avoir un taux de survie de 61.9%. Dans un sol fortement contaminé comme le nôtre, il est idéal de valoriser les cultivars 'S25' et '5005', tous deux issus d'espèces indigènes au Québec. Le cultivar 'S25' s'est

démarqué par sa production de biomasse racinaire et le cultivar ‘5005’ semble être le moins affecté par la contamination avec des taux de survie exceptionnels et une production de biomasse semblable à celle des autres cultivars. De son côté, le cultivar ‘SX61’ ne devrait pas être valorisé pour un projet de phytoremédiation dans ce genre de milieu. Ce cultivar est parmi les plus productifs en termes de production de biomasse en milieu sain (Labrecque and Teodorescu 2005; Tharakan et al., 2005) et en milieu où la contamination est modérée (Grenier et al., 2015), mais sur le site étudié, de forts taux de mortalité ont été observés. Ce cultivar semble avoir un seuil de tolérance à la contamination plus faible comparativement aux autres cultivars à l’étude.

Basés sur nos résultats, nous concluons que la provenance n’a pas d’influence majeure sur la survie, la croissance et la capacité de phytoextraction de dix cultivars de saules plantés en milieu fortement contaminé par les polluants organiques. Dans les plantations de phytoremédiation, l’utilisation de boutures provenant d’un milieu contaminé ne semble pas être un avantage. Pourtant, si la biomasse récoltée est accessible, elle pourrait aussi servir à la production de bouture, sans que cela affecte la productivité des individus.

Références

- Aitchison, E. W., et al. (2000). Phytoremediation of 1, 4-dioxane by hybrid poplar trees. Water Environment Research **72**(3): 313-321.
- Ali, H., et al. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. Chemosphere **91**(7): 869-881.
- Antonovics, J., et al. (1971). Heavy Metal Tolerance in Plants. Advances in Ecological Research. J. B. Cragg, Academic Press. **Volume 7**: 1-85.
- Antonovics, J. (1975). Metal tolerance in plants: perfecting an evolutionary paradigm. Proceedings of the International Conference on Heavy Metals in the Environment, Toronto, Canada(2): 169-186.
- Beckers, G. J. M. and U. Conrath (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. Current Opinion in Plant Biology **10**(4): 425-431.
- Bell, T. H., et al. (2014). Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. The ISME journal **8**(2): 331-343.
- Bialowiec, A. and P. F. Randerson (2010). Phytotoxicity of landfill leachate on willow – *Salix amygdalina* L. Waste Management **30**(8–9): 1587-1593.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes & development **16**(1): 6-21.
- Bissonnette, L., et al. (2010). Phytoextraction of heavy metals by two *Salicaceae* clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial. Plant and Soil **332**(1-2): 55-67.
- Blödner, C., et al. (2007). Warm and cold parental reproductive environments affect seed properties, fitness, and cold responsiveness in *Arabidopsis thaliana* progenies. Plant, cell & environment **30**(2): 165-175.
- Bossdorf, O., et al. (2008). Epigenetics for ecologists. Ecology letters **11**(2): 106-115.
- Boyko, A., et al. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. PloS one **5**(3): e9514.
- Boyko, A. and I. Kovalchuk (2011). Genome instability and epigenetic modification—heritable responses to environmental stress? Current Opinion in Plant Biology **14**(3): 260-266.
- Burgos, P., et al. (2006). Spatial variability of the chemical characteristics of a trace-element-contaminated soil before and after remediation. Geoderma **130**(1–2): 157-175.
- Carpenter, D. O. (2006). Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. Reviews on environmental health **21**(1): 1-24.
- Chaney, R. (1983). Plant uptake of inorganic waste constituents. In *Land Treatment of Hazardous Wastes*, ed. JE Parr, PB Marsh

- Chen J-H, et al. (2008) Comparative morphology of leaf epidermis of *Salix* (*Salicaceae*) with special emphasis on sections *Lindleyanae* and *Retusae*. Botanical Journal of the Linnean Society **157**:311–322
- Cloutier-Hurteau, B., et al. (2014). The sequestration of trace elements by willow (*Salix purpurea*)—which soil properties favor uptake and accumulation? Environmental Science and Pollution Research **21**(6): 4759-4771.
- Corseuil, H. X. and F. N. Moreno (2001). Phytoremediation potential of willow trees for aquifers contaminated with ethanol-blended gasoline. Water Research **35**(12): 3013-3017.
- Cosio, C., et al. (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. Environmental and Experimental Botany **58**(1–3): 64-74.
- Coughtrey, P. J. and M. H. Martin (1978). Cadmium Uptake and Distribution in Tolerant and Non-Tolerant Populations of *Holcus lanatus* Grown in Solution Culture. Oikos **30**(3): 555-560.
- Courchesne, F., et al. (2017). Soil trace element changes during a phytoremediation trial with willows in southern Québec, Canada. Int J Phytoremediation **19**(7): 632-342.
- Cunningham, S. D., et al. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. Trends in Biotechnology **13**(9): 393-397.
- Cunningham, S. D. and D. W. Ow (1996). Promises and prospects of phytoremediation. Plant physiology **110**(3): 715.
- Desjardins, D., et al. (2014). Distribution patterns of spontaneous vegetation and pollution at a former decantation basin in southern Québec, Canada. Ecological Engineering. **64**: 385-390.
- Dietz, A. C. and J. L. Schnoor (2001). Phytotoxicity of chlorinated aliphatics to hybrid poplar (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). Environmental Toxicology and Chemistry **20**(2): 389-393.
- Donohue, K. (2009). "Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **364**(1520): 1059-1074.
- Dos Santos Utmazian, M. N., et al. (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. Environmental Pollution **148**(1): 155-165.
- Drzewiecka, K., et al. (2012). Changes in *Salix viminalis* L. cv. 'Cannabina' morphology and physiology in response to nickel ions – Hydroponic investigations. Journal of Hazardous Materials **217–218**: 429-438.
- Edwards, A. L. (2003). Implementing Institutional Controls at Brownfields and Other Contaminated Sites, American Bar Association.
- Farlane, C. M., et al. (1990). Effect, uptake and disposition of nitrobenzene in several terrestrial plants. Environmental Toxicology and Chemistry **9**(4): 513-520.
- Fieldes, M. and L. Amyot (1999). Epigenetic control of early flowering in flax lines induced by 5-azacytidine applied to germinating seed. Journal of Heredity **90**(1): 199-206.

Fischerová, Z., et al. (2006). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. Environmental Pollution **144**(1): 93-100.

Food and Agriculture organization of the united nations (FAO) et Intergovernmental technical panel on soils (ITPS). Status of the World's soil resources, Main report. 1-648. In : <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>

Farlane, C. M., et al. (1990). Effect, uptake and disposition of nitrobenzene in several terrestrial plants. Environmental Toxicology and Chemistry **9**(4): 513-520.

Ferro, A. M., et al. (1999). Toxicity assessment of volatile organic compounds in poplar trees. Int J Phytoremediation **1**(1): 9-17.

Filippou, P., et al. (2013). Plant acclimation to environmental stress using priming agents. Plant Acclimation to Environmental Stress, Springer: 1-27.

Fischerová, Z., et al. (2006). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. Environmental Pollution **144**(1): 93-100.

Fontana, M., et al. (2017). Stomatal distribution patterns change according to leaf development and leaf water status in *Salix miyabeana*. Plant Growth Regulation **81**:63-70.

Galloway, L. F. and J. R. Etterson (2007). Transgenerational plasticity is adaptive in the wild. Science **318**(5853): 1134-1136.

Gao, Y.-z. and L.-z. Zhu (2003). Phytoremediation and its models for organic contaminated soils. Journal of environmental sciences **15**(3): 302-310.

Gaspar, T., et al. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation **37**(3): 263-285.

Gerhardt, K. E., et al. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Science **176**(1): 20-30.

Gordon, M., et al. (1998). Phytoremediation of trichloroethylene with hybrid poplars. Environmental Health Perspectives **106**(Suppl 4): 1001.

Greger, M. and T. Landberg (1999). Use of Willow in Phytoextraction. Int J Phytoremediation **1**(2): 115-123.

Gregory, R. P. G. and A. D. Bradshaw (1965). Heavy metal tolerance in population of *Agrostis tenuis* Sibth. and other grasses. New Phytologist **64**(1): 131-143.

Grenier, V., et al. (2015). Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil. Trees: 1-11.

Guidi, W., et al. (2012). Establishment techniques to using willow for phytoremediation on a former oil refinery in southern Quebec: achievements and constraints. Chemistry and Ecology. **28**: 49-64.

Guidi Nissim, W., et al. (2013). Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. Biomass and Bioenergy **56**: 361-369.

- Guidi Nissim, W., et al. (2014). Willow short-rotation coppice for treatment of polluted groundwater. Ecological Engineering **62**(0): 102-114.
- Hites, R. A., et al. (2004). Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. Science **303**(5655): 226-229.
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: A Historical Overview. Epigenetics **1**(2): 76-80.
- Jones, K. C. and P. De Voogt (1999). Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. Environmental Pollution **100**(1): 209-221.
- Jowett, D. (1964). Population Studies on Lead-Tolerant *Agrostis tenuis*. Evolution **18**(1): 70-80.
- Kacálková, L., et al. (2014). Chromium, nickel, cadmium, and lead accumulation in maize, sunflower, willow, and poplar. Polish Journal of Environmental Studies **23**(3).
- Keller, C., et al. (2003). Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. Plant and Soil **249**(1): 67-81.
- Kiernan, B., et al. (2003). Clone-site testing and selections for scale-up plantings. Biomass Power for Rural Development Final Report: 1-73.
- Klang-Westin, E. and K. Perttu (2002). Effects of nutrient supply and soil cadmium concentration on cadmium removal by willow. Biomass and Bioenergy **23**(6): 415-426.
- Komives, T. and G. Gullner (2006). Dendroremediation: the use of trees in cleaning up polluted soils. Phytoremediation Rhizoremediation, Springer: 23-31.
- Krishnan, G., et al. (2000). Growth and development of smooth brome grass and tall fescue in TNT-contaminated soil. Environmental Pollution **107**(1): 109-116.
- Kuzovkina, Y. A., et al. (2004). Cadmium and Copper Uptake and Translocation in Five Willow (*Salix* L.) Species. Int J Phytoremediation **6**(3): 269-287.
- Kuzovkina, Y. A. and T. A. Volk (2009). The characterization of willow (*Salix* L.) varieties for use in ecological engineering applications: Co-ordination of structure, function and autecology. Ecological Engineering **35**(8): 1178-1189.
- Kuzovkina, Y. A. and T. A. Volk (2009). The characterization of willow (*Salix* L.) varieties for use in ecological engineering applications: Co-ordination of structure, function and autecology. Ecological Engineering **35**(8): 1178-1189.
- Labrecque, M., et al. (1994). Effect of sludge application on early development of two *Salix* species: productivity and heavy metals in plants and soil solutions. Willow vegetation filters for municipal wastewaters and sludges. A biological purification system. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences: 157-165.
- Labrecque, M., et al. (1997). Biomass productivity and wood energy of *Salix* species after 2 years growth in SRIC fertilized with wastewater sludge. Biomass and Bioenergy **12**(6): 409-417.
- Labrecque, M. and T. I. Teodorescu (2003). High biomass yield achieved by *Salix* clones in SRIC following two 3-year coppice rotations on abandoned farmland in southern Quebec, Canada. Biomass and Bioenergy **25**(2): 135-146.

- Labrecque, M. and T. I. Teodorescu (2005). Field performance and biomass production of 12 willow and poplar clones in short-rotation coppice in southern Quebec (Canada). Biomass and Bioenergy **29**(1): 1-9.
- Landberg, T. and M. Greger (1996). Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. Applied Geochemistry **11**(1): 175-180.
- Larsen, M., et al. (2005). Uptake, metabolism, accumulation and toxicity of cyanide in willow trees. Environmental Science & Technology **39**(7): 2135-2142.
- Latzel, V., et al. (2014). Adaptive transgenerational plasticity in the perennial *Plantago lanceolata*. Oikos **123**(1): 41-46.
- Ma, J., et al. (2013). Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of nitrobenzene with A battery of *Vicia Faba* assay system. Environmental Toxicology and Chemistry **32**(6): 1426-1432.
- Madera-Parra, C., et al. (2015). Phytoremediation of landfill leachate with *Colocasia esculenta*, *Gynerum sagittatum* and *Heliconia psittacorum* in constructed wetlands. Int J Phytoremediation **17**(1): 16-24.
- Martinez-Medina, A., et al. (2016). Recognizing plant defense priming. Trends in Plant Science **21**(10): 818-822.
- MDDELCC: Développement durable, environnement et lutte contre les changements climatiques Québec. Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés. In : <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/sol/inter.htm>
- Mengoni, A., et al. (2010). Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. Plant and Soil **331**(1-2): 5-16.
- Mleczek, M., et al. (2010). Hydroponic estimation of heavy metal accumulation by different genotypes of *Salix*. Journal of Environmental Science and Health, Part A **45**(5): 569-578.
- Molinier, J., et al. (2006). Transgeneration memory of stress in plants. Nature **442**(7106): 1046.
- Mousseau, T. A., et al. (2009). Evolution of maternal effects: past and present, The Royal Society.
- Newman, L. A. and C. M. Reynolds (2005). Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. Trends in Biotechnology **23**(1): 6-8.
- Nissen, L. R. and N. W. Lepp (1997). Baseline concentrations of copper and zinc in shoot tissues of a range of *Salix* species. Biomass and Bioenergy **12**(2): 115-120.
- Nissim, W. G., et al. (2013). Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. Biomass and Bioenergy **56**: 361-369.
- Niu, Z.-x., et al. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. Journal of environmental sciences **19**(8): 961-967.
- O'Niell, W. L. and V. A. Nzungu (2004). In-situ bioremediation and phytoremediation of contaminated soils and water: three case studies. USA-Baltic International Symposium, 2004, IEEE.

- O'Niell, W. L., et al. (2004). Feasibility of in situ bioremediation of perchlorate-contaminated soils. Columbus, Battelle Press: C09.
- Olson, P., et al. (2003). Ecology of rhizosphere bioremediation. Phytoremediation: transformation and control of contaminants: 317-353.
- Peuke, A. D. and H. Rennenberg (2005). Phytoremediation. EMBO reports **6**(6): 497-501.
- Pichtel, J., et al. (2000). Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. Environmental Pollution **110**(1): 171-178.
- Pierzynski, G. M., et al. (2005). Soils and environmental quality, CRC press.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. **56**: 15-39.
- Pitre, F., et al. (2010). Brownfield phytoremediation of heavy Metals using *Brassica* and *Salix* supplemented with EDTA: results of the first growing season. Journal of Environmental Science and Engineering **4**(9): 51.
- Pozo, M. J., et al. (2009). Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact, Springer: 123-135.
- Pulford, I. D. and C. Watson (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. Environment International **29**(4): 529-540.
- Rival, A., et al. (2010). Plant epigenetics: from genomes to epigenomes. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **38**(2): 09.
- Robinson, B. H., et al. (2000). Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. Plant and Soil **227**(1): 301-306.
- Romantschuk, M., et al. (2000). Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environmental Pollution **107**(2): 179-185.
- Rosselli, W., et al. (2003). Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. Plant and Soil **256**(2): 265-272.
- Roy, S., et al. (2005). Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. Plant and Soil **272**(1-2): 277-290.
- Salt, D. E., et al. (1995). Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. Nat Biotech **13**(5): 468-474.
- Salt, D. E., et al. (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. Plant physiology **109**(4): 1427-1433.
- Su, D. and J. Wong (2004). Selection of mustard oilseed rape (*Brassica juncea* L.) for phytoremediation of cadmium contaminated soil. Bulletin of environmental contamination and toxicology **72**(5): 991-998.
- Susarla, S., et al. (2002). Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. Ecological Engineering **18**(5): 647-658.

- Tharakan, P., et al. (2005). Morphological traits of 30 willow clones and their relationship to biomass production. Canadian Journal of Forest Research **35**(2): 421-431.
- Thompson, P. L., et al. (1998a). Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. Environmental Science & Technology **32**(7): 975-980.
- Thompson, P. L., et al. (1998b). Decreased transpiration in poplar trees exposed to 2, 4, 6-trinitrotoluene. Environmental Toxicology and Chemistry **17**(5): 902-906.
- Trapp, S. and U. Karlson (2001). Aspects of phytoremediation of organic pollutants. Journal of Soils and Sediments **1**(1): 37.
- Trapp, S., et al. (2000). A phytotoxicity test using transpiration of willows. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **39**(2): 154-160.
- Trapp, S., et al. (2001). Phytotoxicity of fresh and weathered diesel and gasoline to willow and poplar trees. Journal of Soils and Sediments **1**(2): 71-76.
- Ucisik, A. S. and S. Trapp (2006). Uptake, removal, accumulation, and phytotoxicity of phenol in willow trees (*Salix viminalis*). Environmental Toxicology and Chemistry **25**(9): 2455-2460.
- Ucisika, A. S., et al. (2008). Uptake, accumulation, phytotoxicity, and removal of 2, 4-dichlorophenol in willow trees. Environmental Toxicology and Chemistry **26**(6): 1165-1171.
- Vyslouzilova, M., et al. (2003). As, Cd, Pb and Zn uptake by *Salix* spp. clones grown in soils enriched by high loads of these elements. Plant Soil and Environment **49**(5): 191-196.
- Weih, M. (2001). Evidence for increased sensitivity to nutrient and water stress in a fast-growing hybrid willow compared with a natural willow clone. Tree Physiology **21**(15): 1141-1148.
- Weih, M. and N.-E. Nordh (2002). Characterising willows for biomass and phytoremediation: growth, nitrogen and water use of 14 willow clones under different irrigation and fertilisation regimes. Biomass and Bioenergy **23**(6): 397-413.
- Wiltshire, G. (1974). Growth of plants on soils from two metalliferous sites in *Rhodesia*. The Journal of Ecology: 501-525.
- Woodward, F. (1986). Ecophysiological studies on the shrub *Vaccinium myrtillus* L. taken from a wide altitudinal range. Oecologia **70**:580-586
- Wu, L. and A. Bradshaw (1972). Aerial pollution and the rapid evolution of copper tolerance. Nature **238**(5360): 167-169.
- Yang, J. and Z. Ye (2009). Metal accumulation and tolerance in wetland plants. Frontiers of Biology in China **4**(3): 282-288.
- Yu, X.-Z. and J.-D. Gu (2007). Accumulation and Distribution of Trivalent Chromium and Effects on Hybrid Willow (*Salix matsudana* Koidz \times *alba* L.) Metabolism. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **52**(4): 503-511.
- Yu, X., et al. (2005). Phytotoxicity of Cyanide to Weeping Willow Trees. Environmental Science and Pollution Research **12**(2): 109-113.

Zacchini, M., et al. (2009). Metal Tolerance, Accumulation and Translocation in Poplar and Willow Clones Treated with Cadmium in Hydroponics. Water, Air, and Soil Pollution **197**(1): 23-34.